

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff -



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Genomische Einblicke in die Pathogenese des Epstein-Barr-Virus-assoziierten
diffus großzelligen B-Zell Lymphoms

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

Herrn Julius Ketzer
Geboren am 03.01.1988 in Remscheid

Lübeck, 2021

Berichterstatterin/Berichterstatter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Gebauer

2. Prof. Dr. med. Achim Rody

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.03.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Überblick maligne Lymphome.....	3
1.2. Einteilung	3
1.3. Morphologie und histopathologische Diagnose	4
1.4. Therapie	5
1.5. Prognose.....	6
1.6. EBV-Onkogenese	6
1.7. Das EBV positive DLBCL NOS; bisheriger Stand der Forschung.....	10
1.8. Der NF-Kappa-B-Signalweg und maligne Lymphome	12
1.9. Ausgewählte Gene und ihre Funktion	13
1.9.1 <i>ARID1A</i> und der <i>SWI/SNF</i> Komplex.....	13
1.9.2 <i>KMT2A</i> und <i>KMT2D</i>	14
1.9.3. <i>ANKRD11</i> und p53	15
1.9.4. NOTCH2	16
1.10. Fragestellung der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Fallauswahl	18
2.2. DNA Extraktion und Quantifizierung	19
2.3. <i>Whole genome sequencing</i>	20
2.4. <i>Targeted next generation sequencing</i>	21
2.5. <i>Fluorescence in situ hybridization</i> (FISH) für <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> , <i>BCL6</i> und 6q Aberrationen	25
2.6. Varianten Detektion (Variant Calling)	25
2.7. Kopienzahlveränderung (CNV, <i>copy number variations</i>).....	27
2.8. Netzwerkdiffusionsanalyse und Analyse von Mutationshäufung in Gengruppen	27
2.9. Statistische Analyse.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Patientenkohorte.....	29
3.2. Behandlung und Überleben.....	31
3.3. Whole Genome Sequencing (WGS).....	32
3.4. Mutationssignifikanz und Abgleich der Mutationen mit verwandten Entitäten	35
3.5. Panelsequenzierung (<i>targeted next generation sequencing</i>).....	36
3.6. Validierung der Whole Genome Sequencing (WGS) Daten im Panel	38

3.7. Abgleich der häufigsten onkogenen Mutationen mit verwandten DLBCL	38
Integrierte Analyse der WGS und Panelsequenzierungsdaten.....	38
3.8. Auswirkungen der Mutationen bzw. von Mutationen betroffenen Signalwege auf den Zellstoffwechsel.....	40
3.9. 6q Deletionen sind ein wiederkehrendes Merkmal von DLBCL+ NOS	43
3.10. Auswirkungen auf das Gesamtüberleben.....	44
4. Diskussion	46
4.1. Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit sowie Ausblick auf weitere Projekte.....	50
5. Zusammenfassung.....	53
6. Abbildungsverzeichnis	54
7. Tabellenverzeichnis.....	55
8. Literaturverzeichnis.....	56
9. Anhang	68
9.1. Inferenz Statistik: SPSS Ausgaben;Kaplan Meier Kurven.....	69
9.2. Danksagung.....	71
9.3 Lebenslauf	72
9.4. Erklärung.....	73

1. Einleitung

In der folgenden Arbeit werden aus Gründen der Übersicht und Lesbarkeit die maskulinen Formen verwendet. Hierbei soll kein anderes Geschlecht benachteiligt werden und es sind jeweils alle Geschlechter gemeint.

1.1. Überblick maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind hämatologische, monoklonale Neoplasien, die ausgehend von Lymphozyten primär in lymphatischen Organen manifestieren und sich bei betroffenen Patienten durch Lymphknotenschwellung und oder B-Symptomatik (Fieber, Leistungsknick, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) zeigen. Primär können neben den Lymphknoten alle lymphatischen Organe der Patienten betroffen sein, darunter auch Milz, Thymus, Waldeyer'scher Rachenring und Appendix. Neben diesen lokalisierten Stadien kommt es häufig in späteren Stadien des Krankheitsverlaufes zu einer Dissemination der Erkrankung und Manifestation auch im Knochenmark und außerhalb lymphatischer Organe. Auch ein primär extranodaler Befall wird beobachtet. Weiterhin begünstigen Unreife der betroffenen entarteten Lymphozyten oder Lymphozytenvorläuferzellen eine schnelle Dissemination der Erkrankung.

1.2. Einteilung

Teilt man die klinisch sowie molekularpathologisch sehr heterogene Gruppe der Lymphome auf, so ergeben sich aufgrund ihrer Häufigkeit zwei Hauptgruppen. Diese sind festgelegt in der WHO Klassifikation für hämatologische Neoplasien [133]. Neben den klassischen Hodgkin-Lymphomen, die ihren Ursprung in B-Zellen des Keimzentrums nehmen und im Erwachsenenalter in Europa mit einer Inzidenz von ca. 3/100.000 auftreten und ein zweigipfliges Auftreten mit Manifestation im jungen Erwachsenenalter sowie um das sechzigste Lebensjahr zeigt, wird die zweite, wesentlich größere Gruppe von den Non Hodgkin Lymphomen (NHL) gebildet. Diese haben insgesamt eine deutlich höhere Inzidenz von ca. 10-15/100.000. Inzidenzunterschiede treten weltweit z.T. aber in bestimmten Subgruppen aufgrund genetischer bzw. infektiologischer Besonderheiten einzelner Regionen auf [104]. In diese Gruppe, die sich klinisch und morphologisch als sehr heterogen

präsentieren, gehören Lymphome mit Ursprung aus B- und T- Lymphozyten sowie NK-Zellen (Natural Killer Zellen) [133, 5]. Ihre Einteilung erhalten NHL dabei ausgehend von ihren Ursprungszellen aus B- oder T-Zellreihe sowie Reife derselben. Hier kann bei Herleitung der Ursprungszelle schon eine Einteilung in hochmaligne, niedrigmaligne bzw. indolente Lymphomen getroffen werden, da das biologische Verhalten der Lymphome abhängig vom Grad der Entdifferenzierung ist. Das DLBCL gehört hierbei in die Gruppe der hochmalignen NHL mit dem größten Anteil von 30% der NHL. Die Erkrankung betrifft vor allem ältere Menschen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren und einer leichten Männerwendigkeit bei 60% der Erkrankungen [108].

Die Aufteilung der Untergruppen des NHL hat in den letzten Jahren/Jahrzenten an zusätzlicher Bedeutung gewonnen, da die historisch gewachsenen und zunächst nur morphologisch-histopathologischen Unterscheidungskriterien um eine Plethora an immunhistochemischen und genetischen Diagnostik-Werkzeugen ergänzt wurden. Diese Entwicklung hat die Arbeit für den Kliniker deutlich komplexer gemacht, dabei gleichzeitig aber auch den Weg geebnet, bestimmte Subgruppen der Erkrankung besser therapieren zu können und prognoserelevante Fortschritte in der Therapie für die Patienten zu bewirken [81].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der NHL-Untergruppe der Epstein–Barr Virus positiven diffusen großzelligen B-Zell Lymphome im Folgenden EBV+ DLBCL NOS genannt (NOS: not otherwise specified).

1.3. Morphologie und histopathologische Diagnose

Die Heterogenität in der DLBCL Gruppe setzt sich auch bei den EBV assoziierten DLBCL NOS fort. Es werden verschiedene histopathologische Subtypen unterschieden. Hier wird der monomorphe diffus großzellige Typ vom polymorphen Typ unterschieden. Die Tumorzellen präsentieren sich als Immunoblasten, Zentroblasten und Hodgkin-Reed-Sternbergzellen. Der polymorphe Typ unterteilt sich weiter in den T-Zell/ histiozytenreichen Typ sowie den Hodgkin ähnlichen und transplantatassoziierten lymphoproliferativen Erkrankung ähnlichen Typ. Prognostisch machen diese Unterscheidungen aktuell keinen Unterschied, zeigen aber die deutliche Heterogenität der Gruppe der EBV+ DLBCL NOS [14].

Das DLBCL kann molekularpathologisch weiter in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: In den Keimzentrumstyp (GCB, Germinal Center like B-Lymphozyt), den ABC Typ (aktivierter B-Zell Typ) sowie den primär mediastinalen B-Zell Lymphom Typ (PBML). Hier zeigt sich beim GCB Subtyp, ausgehend vom Genexpressionsmuster der Tumorzelle, eine phänotypische Nähe zum regulären Keimzentrums B-Lymphozyten. Bei allen läuft also das Programm der genetischen Rekombination der Immunglobulinschwerketten weiterhin ab, jedoch können aufgrund der notwendigen Doppelstrangbrüche für diese Rekombination auch hier bereits maligne Transformationen angeschoben werden [95]. Für den häufigsten Typ bei EBV+ DLBCL NOS, den aktivierten B-Zell Lymphozyten Typ gilt, dass dieser über verschiedene Mechanismen, vor allem aber B-Zell Rezeptor Aktivierung und NF κ B Signalweg-Aktivierung (nuclear Faktor Kappa B), eine hohe proliferative Aktivität besitzt [106]. Jede der drei Subgruppen folgt also einem individuellem Weg mit jeweils unterschiedlichen genetischen Transformationen, die ausgehend vom jeweiligen Stadium des B Lymphozyten, dann die Lymphomgenese verursachen [95].

1.4. Therapie

Die bisherige Erstlinien-Therapie des EBV+ DLBCL NOS basiert auf dem Prinzip einer Immunochemotherapie nach dem R-CHOP Protokoll [21]. Diese Therapie besteht, in groben Zügen beschrieben, aus der Gabe einer anthrazyklinbasierten Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon kombiniert mit einem Anti-CD-20 Antikörper (Rituximab, US-Zulassung 1996; Zulassung Europa 1998). Mit Einführung von Rituximab konnte Anfang der 2000er Jahre eine deutliche Verbesserung der bis dahin Standardtherapie mit CHOP erzielt werden [19]. Eine weitere mögliche Therapieergänzung stellt die Radiotherapie dar, wobei ihr aufgrund der Nebenwirkungen nur ein ergänzender Charakter zugeschrieben werden kann. So gibt es zum Beispiel die Möglichkeit eine Therapieerweiterung nach Abschluss der Immunochemotherapie mit Bestrahlung von noch stoffwechselaktiven Lymphommanifestationen (Diagnostik via Positronen Emmissions Tomographie PET-CT) durchzuführen. Hierbei zeigt sich zum Teil ein verbessertes Überleben der Patienten. Wobei sich, vom Stadium der Erkrankung abhängig, nicht alle Patienten für eine Radiotherapie qualifizieren [27]. Gängige Praxis, wie zum Beispiel in pädiatrischen Hodgkin Lymphom-Protokollen ist dies jedoch nicht.

1.5. Prognose

Die Prognose der Patienten mit DLBCL ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Eingang in den klinischen Alltag hat hier der IPI (international prognostic index) gefunden, der an einer großen NHL-Kohorte prognostische Faktoren für den Ausgang der Erkrankung unter Behandlung mit CHOP vor Hinzunahme von Rituximab ermitteln konnte. Im Score werden vier Gruppen unterteilt mit niedrigem Risiko, niedrigem intermediärem Risiko, hohem intermediärem Risiko und hohem Risiko. Abhängig vom Alter (unter oder über 60 Jahren), Serum LDH (normwertig oder erhöht), Stadium (Ann Arbor Klassifikation), Performance Status (via ECOG-Performance Status; Eastern Cooperative Oncology Group) und einer extranodalen Beteiligung (eine oder mehr als eine Region) werden so Punkte vergeben und o.g. Risikokategorien ermittelt. Es existieren mittlerweile mehrere Modifikationen, darunter der R-IPI (revised international prognostic index), der von Sehn *et al.* veröffentlicht, drei Risikogruppen identifiziert [128]. Dieser beruft sich auf dieselben individuellen Faktoren und basiert auf einer R-CHOP behandelten Kohorte. Für diese drei Risikogruppen ermittelte die Arbeitsgruppe ein Gesamtüberleben nach 4 Jahren von 94% (*very good*), 79% (*good*), 53% (*poor*) [129]. Die hier behandelte Tumorentität EBV+ DLBCL NOS liegt bei Diagnose oft schon in fortgeschrittenen Stadien vor, so dass insgesamt die Prognose etwas schlechter ist. Das progressionsfreie Überleben beträgt im Mittel 13 Monate und das Gesamtüberleben im Mittel 36 Monate [119]. Bezüglich des Einflusses von EBV auf DLBCL sind jedoch die bislang z.T. widersprüchlichen Studienergebnisse zu nennen, die in der Ära vor Rituximab, eine deutlich schlechtere Prognose für EBV assoziierte DLBCL fanden, wobei sich der Unterschied unter Immunochmeotherapie mit R-CHOP aber nicht mehr nachweisen ließ [10].

1.6. EBV-Onkogenese

Das humane Herpes Virus 4 (HHV4) wurde 1964 von Yvonne Barr und Micheal Epstein aus den Zellen eines Burkitt Lymphoms isoliert und war damit das erste entdeckte onkogene Virus [25].

EBV (HHV4) gehört zur Gruppe der humanen Herpesviridae und ist ein weltweit vorkommendes, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus. Die EBV Durchseuchung in der Gesamtbevölkerung liegt weltweit in der Population der über 30jährigen bei > 90 % [127].

Gehäuft tritt die erste Infektion, vermittelt durch Tröpfcheninfektion, im Kindes- und vor allem Jugendalter auf, weshalb die Krankheit umgangssprachlich als „*kissing disease*“ bezeichnet wurde. Eintritt findet das Virus über eine Infektion von HNO (Hals-Nasen-Ohren) Epithelien bzw. direkte Infektion von Lymphozyten im Bereich der lymphatischen Organe des HNO-Bereichs [73].

Da im Rahmen der Erstinfektion als charakteristische Begleiterscheinung neben unspezifischen Symptomen wie Lymphadenopathie, Abgeschlagenheit, Fieber, Exanthem und z.T. eine relevante Hepatosplenomegalie auch Blutbildveränderungen mit einem erhöhten Anteil von reaktiv veränderten mononukleären Zellen beobachtet werden, erhielt die Krankheit auch den Namen infektiöse Mononukleose. Im Kleinkindesalter verläuft die Infektion milde und zum Teil asymptomatisch. Jugendliche zeigen häufiger o.g. Symptome [73].

Seit seiner Entdeckung wuchs das Wissen über die Epstein-Barr Virus (EBV) vermittelte Tumorentstehung stetig. Es spielt dabei eine Rolle in der Entstehung von Burkitt Lymphomen, Hodgkin Lymphomen, HIV-assoziierten Non-Hodgkin Lymphomen, Post Transplantation Lymphoproliferative Disorder (PTLD), Lymphoproliferative Disorder (LPD), DLBCL, NK/T-Zell Lymphomen, aber auch beim EBV assoziierten Magenkarzinom sowie speziellen Tumoren des Nasopharynx [146]. Eine Sonderrolle nimmt hier die ebenfalls EBV getriggerte lymphomatoide Granulomatose (LYG, nach Liebow) aus der Gruppe der lymphoproliferativen Erkrankungen ein. Diese zeigt sich phänotypisch in höheren Stadien (Grad 3/3) als EBV+ DLBCL und besitzt deutliche Überschneidungen mit EBV+ DLBCL NOS, so dass hier einige Autoren Grad 3 dieser Erkrankung EBV+ DLBCL LYG nennen [86].

Die EBV-Infektion begleitet Betroffene lebenslang, da unser Immunsystem, analog zu vielen Viren der Familie der Herpesviridae, nur zum Teil in der Lage ist, eine Viruselimination zu erreichen und das Virus z.T. asymptomatisch lebenslänglich persistiert. Dabei werden verschiedene Formen der Viruspersistenz unterschieden. Das EBV-Genom liegt hier extrachromosomal als sogenanntes Episom vor, ähnlich der extrachromosomalen Plasmid-DNA von Bakterien, wobei EBV hier als zellfremdes Genom auftritt. Zunächst werden infizierte B-Zellen durch NK-Zellen und EBV spezifische zytotoxische T-Zellen weitgehend eliminiert, jedoch besteht eine lebenslange Persistenz in B-Lymphozyten, die je nach Abwehrlage durch die Expression unterschiedlicher EBV Latenzgene geprägt ist. Hier werden drei verschiedene Latenztypen unterschieden (siehe Tabelle 1). Abhängig vom

Latenztyp kann es zur Entstehung unterschiedlicher Neoplasien kommen [26]. Bei Reaktivierung werden zusätzlich weitere EBV Gene exprimiert, sodass der lytische Zyklus erneut beginnt und die infizierte Zelle Viruspartikel freisetzt [74, 127].

Tabelle 1 EBV-Latenztypen und zugeordnete Malignome

Genexpression	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3A	EBNA-3B	EBNA-3C	EBNA-LP	LMP-1	LMP-2A	LMP-2B	EBER
Latenztyp I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Latenztyp II	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Latenztyp III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bekannte Neoplasien abhängig vom Latenztyp: I: Burkitt Lymphom II: Nasopharynx Karzinom, Magenkarzinom, Hodgkin Lymphom III: Post Transplantations lymphoproliferative Erkrankung und DLBCL Tabelle modifiziert nach Grafik von Fitzsimmons <i>et. al.</i> [26] Abkürzungen siehe Tabelle 2										

Insgesamt agiert das EBV Virus auf unterschiedlichen Ebenen als onkogenes Agens. Hier können verschiedene Mechanismen unterschieden werden. Über verschiedene EBV nukleäre Antigene (EBNA 1,2,3a,b und 3c, EBNA LP latent protein), EBV-encoded microRNAs (EBV miRNAs) und EBER1 und EBER 2 (nicht kodierender RNA), latent membrane protein (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) erfolgt auf komplexe und z.T. im einzelnen (EBER1 und 2) molekular noch nicht verstandene Weise die Aktivierung von proonkogenen Signalwegen wie NF- κ B, JNK, JAK/STAT, PI3K/Akt sowie die Inhibition von Tumorsuppressorgenen wie *DOK1*, *PKR*, *TP53*, *PRDM1*, *DICE1*, *PTEN*, and *p27kip1*, *p21WAF1/CIP1*, *p16INK4A*, *p73* [146]. Die Rolle der von EBV kodierten Proteine (EBNA) ist hier jedoch besser erforscht, wohingegen der Wirkmechanismus von EBER 1 und 2 nicht gänzlich verstanden ist [26].

In dieser Arbeit soll die EBV induzierte Onkogenese in Bezug auf EBV+ DLBCL erläutert werden. Hierbei spielt vor allem das EBV Latenzmuster III eine wichtige Rolle, bei dem alle oben beschriebenen Mechanismen wirksam sein können. Aus Übersichtsgründen sind im Folgenden die beeinflussten Signalwege und Zielstrukturen der viralen Protein- und RNA-Bestandteile tabellarisch dargestellt.

Tabelle 2 EBV Antigene und ihre molekularen Zielstrukturen

EBV Antigen/RNA	Signalweg/ Zielstruktur	Mechanismus
EBNA 1	MEF2B, EBF1, IL 6R, LMP1	Transkriptionsfaktor für EBV und wirtsspezifische Gene
EBNA 2 EBNA LP (Koaktivator)	LMP-1, cMyc, Cyclin D2	Zellproliferation, Apoptoseinhibition
EBNA 3a	CtBP, Rb CDKN2B via MIZ-1	Zellproliferation
EBNA 3c	Rb, p27, cMyc, E2F1, E2F6, p53	Zellproliferation Apoptoseinhibition
EBER1 und EBER 2	PI3K/Akt, PKR, p21 p27, Bcl2	Zellproliferation Apoptoseinhibition
EBV miRNAs	Wnt, PRDM1, PTEN	Apoptoseinhibition
LMP 1	NF-κB, JNK, p38, MAPK, JAK/STAT PI3K-Akt, p16INK4A p27kip, CDK2, and Rb	Apoptoseinhibition, Zellproliferation
LMP-2A	PI3K/Akt, ITAM/Syk, p27kip.	Zellproliferation

Legende: EBNA 1,2, 3a,3c und LP (EBV nuclear antigen und leader Protein), EBER 1,2 (EBV-encoded small RNA), EBV miRNA (EBV encoded micro RNA), LMP 1,2a (latent membrane Protein), MEF2B (Myocyte enhancer binding factor 2B), EBF1 (Early B-Cell Factor 1), IL6-R (Interleukin 6 Rezeptor), CTB1 (C-terminal-binding protein 1), Rb (Retinoblastom Protein), CDKN2B (Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B), MIZ 1 (Msx-interacting-zinc finger), p27 (cyclin dependend kinase inhibitor 1b), p53 (Protein p53, gleichnamiges Tumorsuppressorgen p53), p21 (cyclin dependend kinase inhibitor 1) Bcl2 (B-cell lymphome regulator protein 2), PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase B pathway), PKR (Protein Kinase R), Wnt (Wnt Signalweg nach dem gleichnamigen Zielprotein Wnt benannt), PRDM1 (PR domain zinc finger protein 1), PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells , NF-kappa-B-Signalweg), JNK c-Jun N-terminale Kinasen), MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinasen), p38 (p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen), JAK/STAT (Januskinase Signal Transducers and Activators of Transcription pathway), p16 INK4A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2), p27^{Kip1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), ITAM/Syk (Immunoreceptor tyrosine activation motif, Syk Tyroninkinase)[146, 26, 74]

1.7. Das EBV positive DLBCL NOS; bisheriger Stand der Forschung

Epstein–Barr Virus positive (EBV+) diffuse großzellige B-Zell Lymphome wurden zuerst 2003 von Oyama *et al.* beschrieben. In dieser Studie wurden 22 ältere Patienten mit überwiegend schlechtem klinischen Verlauf berichtet, die ein unzureichendes Ansprechen auf die damals etablierten Standardtherapien zeigten [117]. Folgende Fallsammlungen von EBV assoziierten DLBCL, basierend auf klinisch-pathologischen Kriterien, führten 2008 zur Übernahme in die World Health Organisation (WHO)-Klassifikation (classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues) [133]. Damals wurde die provisorische Entität EBV+ DLBCL of the elderly eingeführt.

Weil diese heterogene Gruppe von Lymphomen auch bei jüngeren Patienten beobachtet wurde, ersetzte sie damit die bis dahin gültige Kategorie DLBCL des älteren Menschen (DLBCL of the elderly) und wurde dann 2016 in angepasster Form in die Revision der WHO Klassifikation übernommen [133].

Das Verständnis dieser Erkrankung, insbesondere bei jüngeren immunkompetenten Patienten, wuchs in der Folge mit dem Nachweis eines tolerogenen immunologischen (immuntoleranzinduzierenden) Milieus [113]. Mit der Einführung von Anti-CD20-Antikörpern (Rituximab) in die Lymphomtherapie konnte jedoch das klinische Therapieergebnis auch bei EBV assoziierten DLBCL deutlich verbessert werden, womit auch der Hinweis auf EBV Positivität bei Diagnose für die weitere Therapie zunächst an Bedeutung verlor [143]. Weitere therapeutische Meilensteine, die, vergleichbar mit Rituximab, eine Prognoseverbesserung erzielten, blieben bislang aus.

In der ostasiatischen Bevölkerung machen EBV positive DLBCL ca. 8-10% der DLBCL aus [119, 118]. Für die westliche Hemisphäre werden, bei jedoch insgesamt dünner Datenlage, ähnliche bis etwas niedrigere Inzidenzen angenommen [14]. Das Spektrum von EBV assoziierten Läsionen reicht hier von einer reaktiven lymphatischen Hyperplasie bis zu DLBCL und entspricht phänotypisch dem, was auch im asiatischen Raum beobachtet wird [79, 118, 131, 24].

Aktuelle Untersuchungen haben die Rolle von EBV als unabhängiger Risikofaktor für ein schlechteres Therapieansprechen relativiert. Mehrere Studien konnten jedoch bei Patienten mit EBV positiven DLBCL NOS eine Häufung an negativen klinischen Faktoren zeigen. Dazu gehören Stadium der Erkrankung, fortgeschrittenes Alter und sowohl reguläre als auch

alternative NF κ B Signalweg-Aktivierung (Nuclear Faktor Kappa B) mit vielen Fällen vom nicht Keimzentrumstyp, sondern aktivierter B-Zell Immunophänotyp (ABC-Typ) und damit schlechterem Therapieansprechen [99, 131, 87, 115, 106, 114]. Weiterhin zeigen sich beim EBV positiven DLBCL NOS und Immundefizienz bzw. transplantatassoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen (LPDs/PTLDs) deutliche phänotypische Überschneidungen [115]. EBV+ DLBCL (NOS) qualifizieren sich daher besonders für die Erforschung weiterer gezielter molekularer Therapie.

Interessanterweise konnte für die NF κ B Aktivierung bei EBV+ DLBCL (NOS) nachgewiesen werden, dass diese sowohl durch eine EBV induzierte Transkriptionsveränderung als auch durch erweiterte B-Zell Differenzierung hervorgerufen wird [106]. Diese Beobachtung wurde durch Analysen ergänzt, die, abweichend vom ABC DLBCL, seltene Mutationen des MYD88-vermittelten TLR-Signalweges sowie B-Zell-Rezeptor-Signalweges nachwies [29].

Über diese Beobachtungen hinaus, bleibt die genetische Charakterisierung von EBV+ DLBCL (NOS) aktuell weiterhin lückenhaft.

Eine Studie an einer chinesischen Kohorte von 11 Patienten mit EBV+ DLBCL NOS, ohne Keimbahn-DNA, zeigte ein heterogenes Muster an Mutationen, das vor allem mit einer Mutationssignatur mit fehlerhafter homologer Rekombination bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen assoziiert war [98].

Eine neuere *targeted sequencing* Studie mit 9 Patienten wies eine erhöhte Frequenz an *MYC* und *RHOA* Mutationen sowie andere genetische Aberrationen mit Mutationen in *MEF2B* und *MYD88* nach [149]. Während des Verfassens dieser Arbeit erschien eine Publikation über Grauzonenlymphome und deren genetische Charakterisierung. Hier wurden unter anderem auch 20 Fälle von polymorphen EBV+ DLBCL NOS mit analysiert, von denen 7 via WES (*Whole Exom Sequencing*) untersucht wurden. Es fanden sich dort beim Vergleich mit Grauzonenlymphomen insgesamt weniger onkogenetische Treibermutationen. Die dort gefundenen Mutationen zeigten sich mit Schwerpunkt bei *STAT3*, *SOCS1* und *GNA 13*. Weniger häufig mutiert zeigte sich hier *TET2* [18].

Vorausgegangene Studien konnten bislang erste Hinweise auf ein heterogenes Spektrum an möglichen genetischen Einflussfaktoren bei EBV+ DLBCL (NOS) geben. Eine umfassende Analyse der genetischen Hintergründe dieser Erkrankung bei einer repräsentativen Kohorte fehlt bislang allerdings. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Daten aus *whole genome*

Analysen (n=8), targeted sequencing als Panel Diagnostik (zusätzliche 39 Patienten) mit FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) von *MYC*, *BCL2* und *BCL6* sowie im Zuge der Arbeit neu identifizierte 6q Aberrationen analysiert.

Mit diesem Ansatz einer integrierten Analyse möchten wir an der bislang größten publizierten Kohorte onkogenetische Einflussfaktoren, Kopienzahlveränderungen (im folgenden Englisch abgekürzt als CNA; *copy number alteration*) und Störungen in den genetischen Signalwegen aufdecken, um die molekulare Taxonomie von aggressiven B-Zell Neoplasien zu präzisieren.

1.8. Der NF-Kappa-B-Signalweg und maligne Lymphome

Nuclear factor Kappa B (NF κ -B) gehört zu einer Familie an Transkriptionsfaktoren, die in vielen Organismen Prozesse von Zelldifferenzierung, angeborener und erworbener Immunität, Zellüberleben und Proliferation regeln [77].

Die 5 Proteine der NF κ -B Familie formen dabei Homo- bzw. Heterodimere, die an der DNA binden und dort als Transkriptionsfaktor agieren [105]. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Wege den NF κ -B Signalweg zu aktivieren. Hier werden der kanonische und nicht-kanonische Weg unterschieden. Beim kanonischen Aktivierungsweg läuft die zentrale Aktivierung über NEMO (Nf κ -B Essential Modulator), der z.B. bei Inflammationsreaktionen vermehrt aktiviert wird [78]. Beim nicht kanonischen Aktivierungsweg werden über NEMO unabhängige, aber auch IKK (I κ B Kinase Familie) beeinflussende Faktoren die NF κ -B Aktivität reguliert. Dieser Weg spielt vor allem bei Entwicklungsprozessen eine Rolle und beeinflusst z.B. auch die B-Zell-Differenzierung, Reifung und Überleben [22, 105]. Beeinflusst bzw. reguliert werden die Transkriptionsfaktoren der NF κ -B Familie von TNFR (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor), TLR (Toll like Rezeptoren), ILR-1 (Interleukin Rezeptor) sowie Stress, der metabolisch, genotoxisch oder mechanisch sein kann [105].

Wie bereits dargestellt, kann die EBV-Infektion selbst über LMP1 bzw. Interaktion von LMP1 und EBNA2 eine nicht kanonische Aktivierung der NF κ -B Signalkaskade bedingen und eine Rolle bei der Lymphomgenese spielen [146].

Bei B-Lymphozyten sind verschiedene Wege der Erkennung externer Signale über B Zell Rezeptor (BCR) und Toll like Rezeptor (TLR) s.o. möglich, was eine flexible Immunantwort ermöglicht.

Für DLBCL (auch EBV+) wurde bereits nachgewiesen, dass eine Überexpression des NF κ -B Signalweges mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [9]. Diese BCR Signalweg gestützte Daueraktivierung konnte bereits für ABC-DLBCL nachgewiesen werden [142].

Bislang wurden in DLBCL verschiedenste Mutationen gefunden, die eine Überexpression dieses Signalweges bedingen, darunter *MYD-88*, *CARD-11*, *TNFAIP3 (A20)* [120]. Er stellt somit ein interessantes, obgleich aufgrund seiner multiplen Aktivierungswege sehr bewegliches, therapeutisches Ziel dar. Da aus vorhergehenden Arbeiten bereits bekannt ist, dass die genannten Mutationen in der BCR Signalkaskade keine nennenswerte Rolle im EBV+ DLBCL (NOS) spielen, blieb die Genese der NF κ B Aktivierung in dieser Entität bisher unklar und soll daher ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein [142].

1.9. Ausgewählte Gene und ihre Funktion

Basierend auf den Beobachtungen im WGS und *targeted sequencing* im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden einzelne Gene und assoziierte Signalwege im Folgenden orientierend dargestellt um die nachfolgenden Ergebnisse in den aktuell publizierten Kontext setzen zu können

1.9.1 *ARID1A* und der *SWI/SNF* Komplex

ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) kodiert für ein Protein, das Teil des größeren Proteinkomplexes SWI/SNF (Switch/ Sucrose Non Fermentable) ist. Dieser ist an der komplexen Aufgabe des Chromatinremodelling beteiligt, die wiederum Genexpression beeinflusst und steuert. Voraussetzung dafür ist es, die Struktur der Komplexe aus DNA und Histonen, auch Nukleosomen genannt, gezielt zu modifizieren. Aufgrund seiner Schlüsselrolle als zentrale Proteinstruktur des Chromatinremodellings ist der SWI/SNF Komplex ein, über verschiedene Spezies, hochkonserviertes Protein. Bei Mammalia spielt der Komplex u.a. in der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von neuronalen Vorläuferzellen in reife Neuronen [103, 31].

Daher gelangten solche für das Chromatinremodelling verantwortlichen Proteine und Proteinkomplexe schon früh in den Fokus der Wissenschaft, da Veränderungen an diesen Molekülen in einer Vielzahl von Neoplasien nachgewiesen werden konnten [123]. *ARID1A* hat hierbei auf molekularer Ebene die Aufgabe einer Helicase, die ATP abhängig AT-reiche Abschnitte der DNA binden kann. Weiterhin konnten Veränderungen in Proteinstruktur, Methylierungsmuster von *ARID1* bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Insgesamt zeigen sich genetische Veränderungen des SWI/SNF Komplexes bei ca. 20% aller menschlichen Tumoren [82].

Interaktionen mit verschiedenen Proteinprodukten von Tumorsuppressorgenen wie *RB*, *BRCA1* und *cMYC* sind für die Proteine des *SWI/SNF* gut dokumentiert [123]. Gleichzeitig gestaltet die Vielzahl an verschiedenen Interaktionspartnern von SWI/SNF die Suche nach gezielten molekularen Therapien bei Malignomen kompliziert, jedoch kann die zentrale Rolle des Enzymkomplexes genutzt werden, um eine Vielzahl an verschiedenen Therapien zu erforschen bzw. zu entwickeln [100].

1.9.2 *KMT2A* und *KMT2D*

KMT2A/KMT2D kodieren für Proteine, die als Co-Aktivatoren in der Transkription dienen. Für Mutationen in *KMT2D* sind dabei Häufigkeiten von bis zu 30 % bei DLBCL angegeben [2, 148]. Dabei sind sie verantwortlich für epigenetische Transkriptionsregulation als H3 lysine 4 (H3K4) Histon-Methyltransferasen. Sie spielen vor allem in der frühen Embryonalentwicklung sowie Hämatopoese eine wichtige Rolle [110]. Daher rührt auch ihre Assoziation mit Neoplasien und syndromalen Erkrankungen, hierbei vor allem mit Mikrodeletionssyndromen.

Mit Mutationen von *KMT2A* assoziierte neoplastische Erkrankungen, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, sind Vorläufer-B-Zell-Leukämien, AML (mit Fusionstranskript t(9;11) (p22;q23)). Weiterhin sind als Keimbahnmutationen von *KMT2A* variable klinische Phänotypen von syndromalen Erkrankungen beschrieben [51]. Hierbei werden das Kabuki-Syndrom mit typischen Gesichtsmerkmalen, die der japanischen Tradition der Kabuki Tänzer ähneln, Skelettanomalien, Kleinwuchs und milde bis moderate intellektuelle Behinderung sowie das Wiedemann-Steiner-Syndrom mit u.a. Kleinwuchs, multiplen fazialen Dysmorphien, Hypertelorismus, Muskelhypotonie, Hypertrichosis, Krampfnäigung sowie eine leichte bis mittlere Intelligenzminderung beobachtet [109, 116].

Bei *KMT2D* sind als Keimbahnmutationen ebenfalls das Kabuki-Syndrom, aber auch Charge Syndrom (Colobom, Heart anomalies, Atresia of choanes, Growth and developmental Retardation, Genital anomalies, Ear anomalies) und C1 Komplementdefekte beschrieben [3]. Im Rahmen von Neoplasien ist hier das multiple Myelom zu nennen [52].

1.9.3. *ANKRD11* und p53

Das Ankyrin Repeat Domain 11 Gen kodiert für ein Protein, das als Chromatinregulator agiert. Seine Funktion führt es dabei als Histon-Deacetylase aus. Keimbahnmutationen können als klinischen Phänotyp das KBG Syndrom verursachen, das mit mentaler Retardierung, Krampfneigung sowie fazialen Dysmorphien und Auffälligkeiten mit großen Inzisiven einhergeht [4].

Über seine Interaktion mit p53 spielt es jedoch auch eine Rolle bei Neoplasien. Ursprünglich wurde das Protein bei Mammakarzinomenentstehung erforscht. Hierbei zeigten sich erste Hinweise auf eine möglich p53 Interaktion. Es zeigte sich, dass ANKRD11 in der Lage ist die vermehrte Acetylierung von p53 zu vermitteln. Damit steigt die DNA Bindungsfähigkeit von p53, was im Sinne eines positiven Feedbacks zu einer vermehrten Transkriptionsaktivität führt, die letztlich zu Zellzyklusarrest und oder Apoptose führen kann [112]. Damit kann ANKRD11 eine wichtige Funktion im p53 Signalweg zugeordnet werden.

Da p53 in seiner Funktion auch als Wächter des Genoms bezeichnet wird, kann die Rolle von ANKRD11 hier aber nur als kleiner Teil im hochkomplexen Geflecht von p53 assoziierten Ursachen für Onkogenese betrachtet werden [91].

1.9.4. NOTCH2

Das *NOTCH2* Gen kodiert für ein membranständiges Protein dessen extrazelluläre Komponente vor allem aus multiplen EGF-Rezeptoruntereinheiten besteht. Vor allem in Zellverbänden spielen die NOTCH Rezeptoren eine wichtige Rolle bei Organdifferenzierung und Zellwachstum. Physiologisch spielt es bei der Entwicklung einer Vielzahl von Geweben eine Rolle (Leber, Niere, Ovar, T- und B-Zellen) [57]. Es gehört zu einer Reihe ähnlicher NOTCH Rezeptoren. Intrazellulär besitzt es unterschiedliche Domänen, die nach Translokation in den Zellkern Transkriptionsaktivierung verursachen. Dabei sind im Rahmen von Onkogenese vor allem *C-MYC*, *NF-κB*, *p21* und *CyclinD1* zu nennen [147].

Keimbahnmutationen von *NOTCH2* gehen mit dem Alagille-Syndrom Typ 2 einher (Cholestase, Pulmonalarterienstenose, Wirbelfehlbildungen, faziale, retinale und renale Anomalien) [138].

Seine Bedeutung für B-Zell Neoplasien wurde bereits für *Gain of Function nonsense* und *frameshift* Mutationen beschrieben, deren Resultat vornehmlich eine verlängerte Aktivierung der von *NOTCH2* betroffenen Zielgenen ist [145]. So kann ein verändertes NOTCH2 Protein den NF-Kappa-B Signalweg mitaktivieren. In einer Vielzahl anderer Tumoren/Neoplasien wurden ebenfalls aktivierende Veränderungen bei *NOTCH2* nachgewiesen; darunter das Multiple Myelom, das hepatozelluläre Karzinom, das Magenkarzinom, das Glioblastom und das pilozytische Astrozytom [145].

1.10. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der genetische Hintergrund des EBV+ DLBCL NOS charakterisiert werden. Mit der multimodalen Analyse der vorliegenden, großen Kohorte, wird die Frage geklärt, ob es sich bei den genetischen Veränderungen des EBV+ DLBCL NOS um eine distinkte, entitätsspezifische Gruppe von Mutationen handelt. Mit der Kombination aus *targeted*- und *whole genome sequencing* sowie der Ergänzung um die gezielte Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit Sonden prädefinierter Loci soll ein möglichst umfassendes genetisches Bild dieser seltenen Entität auf molekular- und zytogenetischer Ebene gewonnen und eine intermethodische Validierung der einzelnen Untersuchungsansätze erreicht werden. Weiterhin sollen eventuelle Auswirkungen einzelner Schwerpunktmutationen auf die Prognose der Erkrankung untersucht werden. Auf diese Weise soll ein Beitrag für weitere Forschung, insbesondere hinsichtlich gezielter molekularer Therapie bzw. besserer Risikostratifizierung bei der Diagnostik dieser Erkrankung geleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Fallauswahl

Die Fallauswahl und Datenerhebung erfolgte retrospektiv durch Auswertung der Datenbank des hämatopathologischen Labors des Universitätsklinikums Schleswig Holstein am Campus Lübeck. Die Hämatopathologie am Campus Lübeck erhält für die Primärdiagnostik als Referenzlabor Proben von DLBCL Patienten von bundesweiten Einsendern. Für die vorliegende Arbeit wurden Fälle zwischen März 2010 und Dezember 2018 analysiert.

Die Diagnosebestätigung erfolgte durch zwei erfahrenen Hämatopathologen (ACF und HM) entsprechend den Kriterien der aktuellen Ausgabe der WHO Klassifikation für hämatologische Neoplasien aus dem Jahr 2016 [133].

Aus 80 Fällen mit passenden Diagnosekriterien für EBV+ DLBCL (NOS) wurden, nach Selektion für ausreichende DNA-Qualität des Tumormaterials sowie vorhandener Keimbahn DNA, 9 für eine *whole genome* Analyse ausgewählt. Eine Probe musste sekundär aufgrund von mangelnder DNA-Qualität verworfen werden.

Es konnten 39 Fälle mit ausreichender Tumor DNA identifiziert werden, bei denen eine Panel Diagnostik mittels *targeted sequencing* durchgeführt wurde. Bei 32 Patienten konnte an noch vorhandenem Gewebe eine bestätigende FISH (Fluoreszenz in Situ Hybridisierung) Diagnostik für 6q Deletionen durchgeführt werden [30].

Der klinische Verlauf der Patienten wurde den Patientenakten entnommen und zusammen mit dem R-IPI (revised international prognostic index)[129], der hämatopathologischen Beurteilung und Genomanalyse anonymisiert zusammengefasst. Das initiale Stadium der Erkrankung wurde entsprechend der Ann Arbor Klassifikation (modifiziert nach Cotswold) dokumentiert [135]. Die meisten, der hier vorgestellten Patienten wurden zudem in der klinisch pathologischen Studie von Witte *et al.* (2020) untersucht [143].

Ein Ethikvotum des Ethikkomitees der Universität zu Lübeck (Referenz Nr. 18-356) liegt vor und die Studie wurde entsprechend den Maßgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt [1]. Das schriftliche Einverständnis der Patienten zur Verwendung und Weitergabe ihrer klinischen Daten sowie des Tumormaterials für Routinediagnostik und Forschungszwecke durch das Referenzzentrum für Hämatopathologie (Hämatopathologie

UKSH Lübeck/ Hämatopathologie Lübeck Referenzzentrum für Lymphom und Knochenmarkdiagnostik) liegt vor.

Die bioinformatische Verarbeitung und Aufbereitung der Rohdaten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. Axel Künstner aus der Systembiologie der Universität zu Lübeck.

2.2. DNA Extraktion und Quantifizierung

Die genomische DNA wurde aus jeweils 2-4 bis max. 5 µm dicken FFPE (formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe) Gewebeschnitten mit einem RSC DNA FFPE kit (Firma Promega, Wiesloch, Deutschland) oder QuiaAmp mini kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers extrahiert. Hierzu wurden die Proben mit 250 µl Proteinase-Lösung sowie blauer Farbe und 400 µl Mineral Öl in 1,5 ml Eppendorfgefäßen inkubiert. Zellmaterial, Färbung und Proteinase setzten sich am Boden in einer blauen Phase ab, darüber Paraffin und Mineralöl in öliger klarer Phase.

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 56 °C und anschließend für 12 h bei 70 °C weiter inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten auf 80°C weitererhitzt um dann nach fünfminütiger Kühlung mit 10µl RNase Lösung aus dem Testkit versetzt und nach 5-minütiger Reaktionszeit mit 15000 rpm auf einer Mikro 200 Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) abzentrifugiert. Die so gewonnene Lösung wurde in das fertige Extraktionskit gegeben und vom Promega Maxwell RSC automatisiert extrahiert. Die gewonnenen Proben wurden in 500µl Eppendorfgefäßen mit je 70 µl DNase freien Wassers gegeben.

Die Quantifizierung der extrahierten DNA erfolgte photospektrometrisch an einem Nanodrop ND-1000 (Nanodrop®, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA). Dabei wird photometrisch die Absorption bei der für DNA relevanten Wellenlänge von 260 nm gemessen und so der Gehalt an DNA quantifiziert. Gleichzeitig wurden Verunreinigungen mit Protein und Phenolen über die Absorption bei Wellenlänge 280 nm gemessen und aus den Werten ein Quotient gebildet. Zielwerte für eine reine DNA Probe sind hier ca. 1,8-2 (A260/A280) [136].

2.3. *Whole genome sequencing*

Das *whole genome sequencing* (WGS) wurde auf einer HiSeq2500 Plattform (Illumina, San Diego, California, USA) in Kooperation mit der Genomics core facility am *European Molecular Biology Laboratory* in Heidelberg (EMBL) durchgeführt. Alle Proben bei denen eine erfolgreiche Sequenzierbibliothek erstellt werden konnte (8/9) (*library preparation*), wurden in der Folge sequenziert. Die verbleibende Probe wurde aufgrund von mangelnder DNA-Qualität nicht verwendet.

Das WGS wurde mittels *next generation sequencing* durchgeführt. Hierbei werden mittels massiver Parallelisierung der Sequenzierung große Mengen an PCR-Produkten (*Polymerase Chain Reaction*) parallel analysiert. In groben Zügen beschrieben besteht die Sequenzierung aus drei verschiedenen Schritten [8].

1. Erstellen der Sequenzierbibliothek (*Library Preparation*)

Die aufgereinigte DNA-Probe wird fragmentiert (mechanisch und enzymatisch) und die resultierenden Fragmente von ca. 200-1000 Basenpaaren (Länge an 3' und 5' Ende) an einen DNA Adapter ligiert. Dieser kann später im Sinne eines molekularen Barcodes bei bekannter Sequenz wieder identifiziert werden. Er enthält weiterhin eine Sequenz für die später verwendeten Primer. Bei einem Illumina Assay werden die Fragmente auf einem Glasträger an sogenannte Adapter Oligonukleotide gebunden. Aufgrund der Adaptersequenzen kommt es zur Ausbildung von DNA-Brücken zwischen Adaptern und Oligonukleotiden (*bridging*).

2. *Library Amplification*

Nach Binden aller Fragmente wird mittels einer Brücken-PCR die vorhandene DNA amplifiziert. Dazu werden in jeweils vielen wiederholten Schritten Primer und Nukleotide hinzugegeben und die vorhandenen Einzelstränge werden verdoppelt. Auf diese Weise kann die benötigte Menge an DNA für eine massive Parallelisierung der Sequenzierung amplifiziert werden, da am Ende der Amplifikation jedes DNA-Fragment mehrere hundert bis tausend Male vorliegt. Hier liegt auch der Unterschied für die grundsätzliche Sensitivität von verschiedenen NGS Ansätzen. Werden beim *targeted next generation sequencing* im

Sinne einer Paneldiagnostik nur eine begrenzte Anzahl an Genen untersucht, können so sehr viel mehr Kopien der zu untersuchenden Abschnitte gewonnen werden, wohingegen die Zahl der analysierten Fragmente (*reads*) beim *whole exome sequencing* (WES) und mehr noch beim WGS deutlich geringer sind [8].

3. Klonale Sequenzierung

Die so gewonnene amplifizierte DNA wird nun sequenziert. Hierbei werden jeweils einzelne fluoreszenzmarkierte Basen in Einzelschritten adaptiert und dabei vom System über unterschiedliche Farben optisch ausgelesen und sequenziert (*sequence by synthesis*). Die so sequenzierten Abschnitte überlappen, einer zufälligen Verteilung folgend und können bioinformatisch im Vergleich mit einem Referenzgenom zu einer kompletten DNA zusammengesetzt werden. Je höher hier die Abdeckung, sprich Dopplung von DNA-Fragmenten gleicher Sequenz, desto sensitiver ist die Methode für die Detektion subklonaler Veränderungen. Hierbei werden jeweils beide 3'5'- und 5'3'-Fragmente getrennt sequenziert, um später eventuelle Sequenzierartefakte bzw. Basenveränderungen durch PCR-Fehler zu erkennen [8].

Die EBV+ DLBCL NOS Proben wurden mit einer 30-fachen durchschnittlichen Tiefe sequenziert.

2.4. Targeted next generation sequencing

Beim *targeted next generation sequencing* werden, als Unterschied zum WGS, keine zufälligen Basenfolgen (Primer) für den Start der Amplifikation verwendet, sondern die Primer der zu untersuchenden Gene eingesetzt. Damit kann gezielt sequenziert werden und eine höhere Abdeckung erreicht werden. Auch hier kann über das Legieren von spezifischen Wiedererkennungsequenzen bei der Amplifikation später in der Sequenzierung mit mehreren Proben gleichzeitig gearbeitet werden. Da die DNA-Fragmente hier nicht ungezielt sondern Primer abhängig den gesuchten Zielgenen entsprechen, kann hier deutlich tiefer sequenziert werden. D.h. die Abdeckung ist hier wesentlich größer.

Zur Validierung der Ergebnisse und Vertiefung der molekularen Charakterisierung der Entität wurde ein AmpliSeq Panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,

USA) entworfen, das Exone von 43 Genen umfasst, die sich in der *whole genome* Sequenzierung unserer EBV+ DLBCL (NOS) sowie in der bis dato publizierten Literatur zum EBV-negativen DLBCL verändert zeigten (siehe Tabelle 1). Diese Paneldiagnostik wurde bei 47 Patienten durchgeführt und abhängig von der Menge und Qualität des noch verfügbaren Tumormaterials bei insgesamt 8 Patienten zusätzlich zum WGS.

Die "*library preparation*" wurde entsprechend den Hinweisen des Herstellers durchgeführt und das *targeted next generation sequencing* auf einer Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, California, USA) bis zu einer medianen Sequenziertiefe von 2416x (SD +/- 1057). Die Rohdaten wurden als fastq Dateien in der EGA Datenbank (European genome-phenome archive) hinterlegt.

Diese Diagnostik wurde in Kooperation mit unserem Partnerlabor in Birkenfeld unter Laborassistenz durch Dr. rer. nat. Wolfgang Peter, Peter Trojok und Yannik Busch durchgeführt.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde ein custom AmpliSeq panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) entworfen, das Exone von 44 Genen umfasst, die sich bei EBV+ DLBCL (NOS) in der bisherigen Forschung verändert zeigten (siehe Tabelle 1). Diese Paneldiagnostik wurde bei 47 Patienten durchgeführt und abhängig von der Menge und Qualität des noch verfügbaren Tumormaterials bei insgesamt 8 Patienten zusätzlich ein WGS.

Die *library preparation* wurde entsprechend den Hinweisen des Herstellers durchgeführt und das *targeted next generation sequencing* auf einer Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, California, USA) bis zu einer medianen Sequenziertiefe von 2416x (SD +/- 1057). Die Rohdaten wurden als fastq Dateien in der EGA (European Genome-phenome Archive) hinterlegt.

Tabelle 3 Untersuchte Gene im NGS Panel und orientierende Schilderung des kodierten Proteins neben Funktion und Rolle in der Signaltransduktion

Gen	Protein/ Funktion/ Signaltransduktionsweg
<i>ANKRD11</i> (Ankyrin repeat domain 11)	interagiert mit der Histon-Deacetylase und p53, Keimbahnmutationen können KBG-Syndrom verursachen (u.a. mentale Retardierung, Zahnfehlbildungen)[28, 102]
<i>ARID1A/ARID2</i>	Proteinuntereinheit des SWI/SNF (Switch/ Sucrose Non Fermentable) Komplex, der am chromatin remodeling und damit an Steuerung von Genexpression aber auch DNA Reparatur beteiligt ist, gilt als Tumorsuppressorgen[103, 130].
<i>B2M</i> (Beta-2-Mikroglobulin)	Bestandteil des MHC Klasse 1 Komplexes, beteiligt an der Peptidantigenpräsentation[32]
<i>BCL2</i> (B-cell-lymphoma 2)	Apoptose Suppressor, multiple Interaktionen mit Caspasen, beeinflusst Permeabilität der Mitochondrienmembran[33]
<i>BCL6</i> (B-cell-lymphoma 6)	Repressor Protein mit komplexer Funktion, beeinflusst in erster Linie in Keimzentrums B-Lymphozyten Gene für Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellzykluskontrolle[34]
<i>BTG 2</i>	mRNA-Deadenylierung damit antiproliferative Wirkung, Regulation von Übergang G1/S Phase des Zellzyklus[35]
<i>CARD11</i> (Caspase recruitment domain family member 11)	T-Zell Proliferation und NF- κ -B Aktivierung über T-Zell-Rezeptor (auch BCL10 und IKK), Aktivierung des TORC1 Signalweges[36]
<i>CCR6</i> (C-C Motiv Chemokin Rezeptor)	Ligand für Chemokine (CCL10), aber auch Defensine, beteiligt an Immunprozessen als Signaltransduktionsprotein sowie T-Zell Differenzierung[37]
<i>CCR 7</i> (C-C Motiv Chemokin Rezeptor)	Ligand für Chemokine, Immunprozesse, B- und T-Zell Aktivierung, wird durch EBV induziert[38]
<i>CD274</i> (Cluster of differentiation)	Ligand für Rezeptoren auf T-Zellen, Immun-(selbst) Toleranz, anti-Autoimmunität, von Tumoren zur Abwehr zytotoxischer T-Zellen genutzt, erhöhte Expression bei de novo DLBCL[40, 90]
<i>CD58</i>	Ligand für das T-Zell CD2 Glycoprotein. Regulation antigen- (un) abhängiger T-Zell Interaktion mit Zielzellen und Antigen präsentierenden Zellen[41]
<i>CD70</i>	Oberflächenantigen auf aktivierten B- und T-Zellen, Zytokin, Ligand für CD27, Tumor necrosis factor Liganden Superfamilie, Proliferationsinduktion kostimulierter T-Zellen, T- und B-Zell, NK-Zell- Aktivierung und Ig-Synthese[39]
<i>CD79A/CD79B</i>	B-Zell Antigen Rezeptor, Initialisierung der BCR-Signalkaskade (zentrales Protein bei Antigenbindung und Signalweitergabe)[69]
<i>CREBBP</i> (CREB binding protein)	Komplexe Funktion über Transkriptionsremodelling (u.a. Histondeacetylierung), wichtig für Embryonalentwicklung, Wachstumskontrolle, Translokationen die CREBBP umfassen bei AML nachgewiesen.

<i>Fortsetzung CREBBP</i>	Keimbahnmutationen mit Rubinstein Taybi Syndrom als klinischer Phänotyp[42]
<i>CSKN2B</i> (Casein Kinase 2 Beta)	Proteinkinase mit multipler Funktion, u.a. Einfluss auf TP53 Aktivierung, Zell- Proliferation und Differenzierung[43]
<i>CXCL10</i> (C-X-C Motiv Chemokin Ligand)	Zytokin, proinflammatorisch, Apoptoseregulation und Migration von Immunzellen[44]
<i>DAPK1</i> (Death Associated Proteine Kinase)	Proteinkinase mit Einfluss auf Apoptose, Zelltod und Autophagie[70]
<i>EZH2</i> (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)	Transkriptionsrepression von Genen der zirkadianen Rhythmik sowie Stammzellendifferenzierung[45]
<i>FAS</i> (FAS cell surface death receptor)	Apoptoseinduktion über Caspase 8[46]
<i>FOXO1</i> (Forkhead Box O1)	Transkriptionsfaktor, Zielprotein der Insulinregulation von metabolischer Homöostase und Reaktion auf oxidativen Stress. Mutationen bei Rhabdomyosarkomen bekannt[47]
<i>HIST1H1E</i> (H1 Histone family member 4)	Histon-Chromatin Remodeling, Regulation von Gentranskription[48]
<i>ID3</i> (Inhibitor of DNA Binding 3, HLH Protein)	Transkriptionsregulator (negative Regulation von Transkriptionsfaktoren), beteiligt an Seneszenz, Wachstum, Angiogenese, Neoplasieentstehung und Apoptose. Mutationen beschrieben in Burkitt Lymphomen[49]
<i>IRF 4</i> (Interferon regulator Faktor 4)	Bindet an den MHC Klasse I Promotor, fungiert als Transkriptionsaktivator[50]
<i>KMT2A</i> (Lysin Methyltransferase 2A)	Histonmethyltransferase, Hämatopoese[51]
<i>KMT2D</i> (Lysin Methyltransferase 2D)	Histonmethyltransferase[52]
<i>MEF2B</i> (Myocyte Enhance Factor 2B)	Transkriptionsaktivator[53]
<i>MYC</i> (MYC Protoonkogen)	Transkriptionsfaktor, Neoangiogenese, in einer Vielzahl von Neoplasien beteiligtes Protein[54]
<i>MYD 88</i>	Signaltransduktion im IL1 und TLR Signalweg, Angeborene und adaptive Immunantwort[55]
<i>NELL2</i> (Neural EGFL like 2 Protein)	Glykoprotein, beteiligt am MAPK Signalweg, Nervenzellendifferenzierung[56]
<i>NOTCH2</i> (NOTCH Rezeptor 2)	Komplexe Funktion, Transkriptionsaktivator, Zell-Differenzierung, Apoptose[57]
<i>PIM1</i> (PIM 1 Protoonkogen)	Proteinkinase, Aktivierung von MYC, Zellproliferation, antiapoptotische Effekte[58]
<i>PRDM1</i> (PR Set Domain 1)	Transkriptionsfaktor, angeborene und erworbene Immunität, Differenzierung von gewebsständigen T-Lymphozyten, NK Zellen in nicht lymphatischen Geweben[59]
<i>SOCS1</i> (Suppressor of Cytokine Signaling1)	Suppressor von Cytokin-Signalwegen im Sinne eines negativen Feedbacks, vor allem beim JAK/STAT3 Signalweg[61]
<i>SOCS2</i> (Suppressor of Cytokine Signaling1)	Suppressor von Cytokin-Signalwegen im Sinne eines negativen Feedbacks, vor allem beim GH/IGF Signalweg [62]
<i>STAT6</i> (Signal Transducer and Activator of Transcription)	Interleukin 3 und 4 pathway, Signaltransduktion und Transkriptionsaktivierung
<i>TCF3</i> (Transkriptionsfaktor 3)	Transkriptionsaktivator, Differenzierung von Nervenzellen und B-Lymphozyten[63]
<i>TLR9</i> (TOLL like receptor 9)	Pathogenerkennung bei angeborener Immunität[64]

TMEM30A (Transmembranprotein 30A)	Transport von Aminophospholipiden zur Zellmembran[65]
TNFRSF21 (TNF Receptor Super Family 21)	Apoptose über NF Kappa B Signalweg[66]
TP53 (Tumor Suppressor Gen 53)	Regulationsprotein mit komplexer Funktion, dass Apoptoseinduktion, DNA Reparatur und Seneszenz vermittelt[67]
YY1 Transkriptionsfaktor	Transkriptionsfaktor, Chromatin Remodelling, DNA Reparatur[68]

2.5. *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) für *MYC*, *BCL2*, *BCL6* und 6q Aberrationen

Chromosomenbrüche wurden mittels herkömmlicher kommerziell erhältlicher FISH-Sonden (*dual colour break apart*) für 8q24 (*MYC*), 18q21 (*BCL2*) und 3q27 (*BCL6*) (Abott Vysis, Des Plaines, Illinois, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Diagnostik wurde in der Hämatopathologie unter der Aufsicht von Dr. rer. nat. Veronica Bernard in Lübeck durchgeführt.

Weiterhin wurde eine eigens angefertigte FISH-Sonde zum Nachweis von 6q Aberrationen, die *PRDM1* und (*TNFAIP3/A20*) abdecken, eingesetzt. Diese Diagnostik wurde im Institut für Tumorgenetik Nord in Kiel in Zusammenarbeit mit Dr. med. Lana Harder, Katharina Ratjen und Dr. rer. nat. Stefan Gesk durchgeführt.

2.6. Varianten Detektion (Variant Calling)

Die DNA-Sequenz lag nach *whole genome* Sequenzierung im sogenannten *raw* FASTQ Format vor. Nach Trimmen der Daten (Entfernen von Adaptersequenzen und Qualitätskontrollwerten) mit FASTP (v0.20.0; minimale *read* Länge 50 bp, max 30% unbestimmter Basen) wurden die getrimmten einzelnen Sequenzen (Reads) anhand des Referenzgenoms GRCh37/hg19 mit BWA MEM (v0.7.15) kartiert [96, 15]. Das resultierende Text-SAM Dokument (*sequence alignment map*) wurde in ein binäres Dokument mit *Picard Tools* (v2.18.4) konvertiert. Anschließend wurden die Informationen zu den jeweils überlappenden Basensequenzen (*mate pairs*) gespeichert, Duplikate entfernt und eine Qualitätskontrolle mit *Picard Tools* und *dbSNP v 138* durchgeführt [80]. SNV (*Single Nucleotide Variants*) sowie kurze Insertionen oder Deletionen wurden entsprechend der Vorgaben mit dem *MUTECT2* Algorithmus detektiert (*GATK best practices*) [16]. Der

Keimbahnabgleich erfolgte anhand der *GNOMAD* Datenbank (*genome aggregation database*) sowie der Abgleich der Tumor DNA mit der Referenzgenomdatenbank b37.

FFPE fixationsinduzierte Artefakte wurden in der Folge registriert und beseitigt. Dies ist aufgrund der Tendenz von Basenveränderungen durch Formalinfixation notwendig. Formalinfixation bedingt durch Deaminierung C-T und G-C Veränderungen, die aber vor allem im Einzelstrang auftreten. Daher können entsprechende Algorithmen diese detektieren und eliminieren [23]. Die gefilterten Varianten werden mittels der *ANNOVAR* Software (v2019Oct24) gespeichert [139]. Mit *VCF-Query* (VCFTools v0.1.13) werden nun die einzelnen *Coverage* Werte für die alternativen Allele der einzelnen Varianten sowie die Referenz extrahiert. Die 20 am häufigsten mutierten Gene wurden aus der weiteren Analyse entfernt. Diese werden auf Grundlage bisheriger Erkenntnisse über pathogene Varianten bzw. häufig auftretender, harmloser Veränderungen ohne erkennbare phänotypische Relevanz (Polymorphismen) entfernt. Hierzu wurde eine Referenzdatenbank zum Erkennen der häufigsten genetischen Polymorphismen verwendet (FLAGS [132]). In der weiteren Analyse wurden die detektierten kodierenden/exonischen somatischen Varianten nach folgendem Schema gefiltert: minimale Coverage 10x, minimale PAF (population allele frequency; Frequenz der Veränderungen in der Normalbevölkerung < 0.001) in der *GNOMAD* oder *POPFREQMAX* Datenbank. Zur Detektion von Genen, mit einer Mutationsfrequenz über das, bei zufälliger Verteilung, zu erwartende Maß hinaus, wurde *MutSigCV* (v1.41) verwendet und potentielle onkogenen Mutationen mit einem p Wert von $< 0,05$ dargestellt [93].

Die Resequenzierungsdatenanalyse der Panel Daten wurde ebenso wie für die WGS Daten durchgeführt, bis auf die Ausnahme, dass Duplikate nicht entfernt wurden. Die Variantendetektion erfolgte mit *FREEBAYES* (v1.3.2-46-g2c1e395). Nach Filtern der Varianten nach minimaler Coverage von 100x und minimaler PAF von 0,001 in den Datenbanken von *GNOMAD* oder *POPFRQMAX* wurden die übrigbleibenden Mutationen zur weiteren Analyse ausgewertet.

2.7. Kopienzahlveränderung (CNV, *copy number variations*)

Um somatische CNV nachzuweisen wurde ein Fragment- und Zuordnungsfähigkeits-basierter GC Korrekturalgorithmus verwendet. Die Analyse der so normalisierten Fragment-Anzahlen wurde in ca. 10kbp Fenstern, abhängig von der jeweils regionalen Abdeckung, durchgeführt. Auf diese Weise wurde nach Abweichung von der erwarteten Kopienzahl 2 gesucht, um so, abhängig von der lokalen Sequenztiefe, Hinzugewinne und Verluste darzustellen [11]. Die Analyse hinsichtlich der neutralen Kopienzahlveränderungen mit einem Verlust der Heterozygotie (CN2LOH, *copy number neutral loss of heterozygosity*) wurde mit der 1000 Genomes SNP Datenbank durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als haplotype Blöcke stufenweise dargestellt, um individuelle gemittelte SNP B-Allel Frequenzen zu mitteln. Durch dieses Verfahren konnten die SNP-B-Allel Frequenzen der Rohdaten aus dem FFPE Material bereinigt werden.

2.8. Netzwerkdiffusionsanalyse und Analyse von Mutationshäufung in Gengruppen

Die Analyse der WGS Daten bezüglich Mutationssignifikanz erfolgte mit *MUTSIGCV* (s.o.) [93]. Auswirkungen von signifikanten und mutmaßlich treibenden onkogenen Mutationen auf benachbarte Gene wurden nach Identifikation durch *MUTSIGCV* mittels einer Netzwerkdiffusionsanalyse analysiert. Dabei wurde mathematisch der Ansatz eines Laplace Filters (STRINGDB v11) anhand eines Protein-Protein Interaktionsnetzwerk (DIFFUSTATS R *package* v1.10.0) verwendet [121, 134]. Mutierte Gene erhalten dabei den Wert 1, nicht mutierte den Wert 0, um das Verhalten der Mutation zu modellieren. Die Netzwerk-Diffusion wurde dann mit einer parametrischen Methode unter statistischer Normalisierung (z-Score) durchgeführt. Mit dem *GSVA* R Paket (v1.38.0) wurde im Folgenden mittels eines Gauss-Filters für stetige Variablen die Variationsanalyse durchgeführt, um über-zufällig beeinträchtigte Signaltransduktionswege zu erfassen. Als Vergleichswerte wurden hier die Gengruppen von *HALLMARK* (R Paket MSIGDF, minimale Größe des Gensets 10, maximale Größe des Gensets 500; MSIGDB v7.1) sowie des NF κ -B Signalwegs (Gene aus *KEGG* entnommen, entry ID hsa04064) [76, 97, 137]. Die resultierenden z-Scores wurden mittels eines rank-MANOVA (Multivariate Varianzanalyse) basierten Ansatzes verarbeitet, um Gengruppen mit vermehrten Mutationen zu detektieren [84, 20].

2.9. Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit R (v4.0.1.) und Tidyverse (v1.3.0) durchgeführt [141]. Zum Darstellen bestimmter Regionen im Genom und Visualisierung der Daten wurden GENOMICRANGES R (v1.40.0) und MAFTOOLS (v2.4.05) verwendet [92, 101]. Für die Analyse der klinischen Daten und die Integration mit den Mutationsdaten verwendeten wir SPSS (IBM, Version 22), hierbei wurden, soweit nicht anders beschrieben, der Chi Quadrat bzw. Fisher's exact Test verwendet. Progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) wurden ab der Diagnosestellung bis zum letzten klinischen Kontakt bzw. der Progression oder dem Tod berechnet. Für die Abschätzung von Einflussfaktoren, insbesondere einzelner mutierter Gene, wurde die Kaplan Meier Methode und der univariate Log-rank Test verwendet. Die Analyse des Überlebens wurde mit den R Paketen SURVIVAL (v3.2-7) und SURVMINER (v0.4.8) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkohorte

Die in unserer Studie untersuchten 47 Patienten mit EBV+ DLBCL (NOS) waren im Mittel 68,19 Jahre alt (Median 74, 19-90 Jahre), davon 18 Frauen. Die Altersverteilung bei den Frauen lag im Mittel bei 72,17 Jahren (Median 77,5, Spanne 34-90 Jahre) sowie bei den Männern im Mittel bei 65,72 Jahren (Median 68, Spanne 19-90 Jahre). Das Gesamtüberleben (OS, *overall survival*) lag im Mittel bei 47 Monaten (Median 53, Spanne 1-126 Monate), das Überleben ohne Progression der malignen Grunderkrankung (PFS, *progression free survival*) bei 40 Monaten (Median 26, Spanne 1-126 Monate). Patienten, die rezidierten (40,4%), überlebten nach Rezidiv im Mittel 17,8 Monate (Median 8, Spanne 0-51 Monate). Bezogen auf das Geschlecht ergab sich hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit kein bedeutender Unterschied (Rezidive weiblich 44,4 %, männlich 37,9%).

Bezogen auf den immunhistochemisch bestimmten GCB vs Non-GCB Subtyp nach Hans *et al.* konnten in der Kohorte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Versterbens an der Erkrankung, Rezidiv und Dauer des Gesamtüberlebens festgestellt werden [75].

Auch das Geschlecht der Patienten stellte keinen signifikanten Einflussfaktor auf Versterben an der Erkrankung, Rezidiv und Dauer des Gesamtüberlebens dar. Die Berechnungen hierzu finden sich im Anhang mit entsprechenden Tabellen. Die klinischen Charakteristika der Patientenkohorte (inkl. der *whole genome sequencing* Subgruppe) sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Im Anhang findet sich noch eine zusätzliche Tabelle mit den klinischen Charakteristika der Subgruppe, an der die 6q FISH durchgeführt wurde.

Tabelle 4 Klinikopathologische Merkmale der EBV+ DLBCL NOS Kohorte

Merkmale	Whole Genome Seq (n = 8)	Targeted Seq (n =39)	EBV + DLBCL NOS (n = 47)
Alter (Jahre; Median + Spanne)	76.5 (68 – 83)	69.5 (19 – 90)	74.0 (19 - 90)
Geschlecht			
Weiblich	2 (25.0%)	16 (41.0%)	18 (38.3%)
Männlich	6 (75.0%)	23 (59.0%)	29 (61.7%)
R-IPI			
0	-	4 (10.3%)	4 (8.5%)
1-2	5 (62.5%)	21 (53.8%)	26 (55.3%)
>2	3 (37.5%)	19 (48.7%)	22 (46.8%)
Stadium (Ann Arbor)			
I	1 (12.5%)	6 (15.4%)	7 (14.9%)
II	3 (37.5%)	14 (35.9%)	17 (36.2%)
III	3 (37.5%)	6 (15.4%)	9 (19.1%)
IV	1 (12.5%)	13 (41.0%)	14 (29.8%)
B-Symptome			
Ja	3 (37.5%)	21 (53.8%)	24 (51.1%)
Nein	5 (62.5%)	18 (46.2%)	23 (48.9%)
CD30 by immunohistochemistry			
Positiv	7 (87.5%)	29 (74.4%)	36 (76.6%)
Negativ	1 (12.5%)	10 (25.6%)	11 (23.4%)
Extranodaler Befall			
0	6 (75.0%)	16 (41.0%)	22 (46.8%)
1-2	2 (25.0%)	23 (59.0%)	25 (53.2%)
ECOG PS			
0-1	5 (62.5%)	15 (38.5%)	20 (42.6%)
≥2	3 (37.5%)	24 (61.5%)	27 (57.4%)
LDH			
Normal	2 (25.0%)	18 (46.2%)	20 (42.6%)
Erhöht	6 (75.0%)	21 (53.8%)	27 (57.4%)
ZNS Beteiligung bei Diagnose			
Ja	-	3 (7.7%)	3 (6.4%)
Nein	8 (100.0%)	36 (92.3%)	44 (93.6%)
Erstlinientherapie			
CHOP-like	8 (100.0%)	25 (64.1%)	33 (70.2%)
R-basiert	8 (100.0%)	35 (89.7%)	43 (91.5%)
Andere	-	2 (5.1%)	2 (4.3%)
Ablehnen der Therapie	-	1 (2.6%)	1 (2.1%)
Ansprechraten auf Erstlinientherapie			
Komplettes Ansprechen (CR)	7 (87.5%)	23 (59.0%)	30 (63.8%)
Sehr gutes Teilansprechen (VGPR)	1 (12.5%)	2 (5.1%)	3 (6.4%)
Teilansprechen (PR)	-	8 (20.5%)	8 (17.0%)
Stabile Erkrankung (SD)	-	4 (10.3%)	4 (8.5%)
Fortschreiten der Erkrankung (PD)	-	2 (5.1%)	2 (4.3%)
Legende Tabelle 4: EBV: Epstein Barr Virus; ZNS: Zentrales Nervensystem; LDH: Lactat Dehydrogenase; ECOG: Eastern cooperative oncology group; PS: performance status; CHOP: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolone; R, Rituximab; Andere: z.B. Bendamustin oder palliative zytoreduktive Behandlung; CR: Complete Response; VGPR: Very Good Partial Response, PR: Partial Response; SD: Stable Disease; PD: Progressive Disease			

3.2. Behandlung und Überleben

Die Erstlinien-Behandlung der Patienten erfolgte, nach Angabe der klinischen Daten durch die Einsender, vor allem mit Rituximab basierter Immunochemotherapie. Der überwiegende Teil der Patienten erhielt R-CHOP (70,2 %). Weiterhin erfolgte die Behandlung mit Rituximab Monotherapie (2,8 %), Rituximab und Bendamustin (14,9%) sowie bei einzelnen nach MATRIX (Hochdosis MTX, Thiotepa und Cytarabin) Protokoll mit autologer Stammzelltransplantation, CHOP und nach GMALL B-NHL 2002 Protokoll.

Für das Gesamtüberleben zeigt sich in unserer Kohorte ein für EBV+ DLBCL NOS prognosetypisches Bild mit ca. 50% 5 Jahres Überleben.

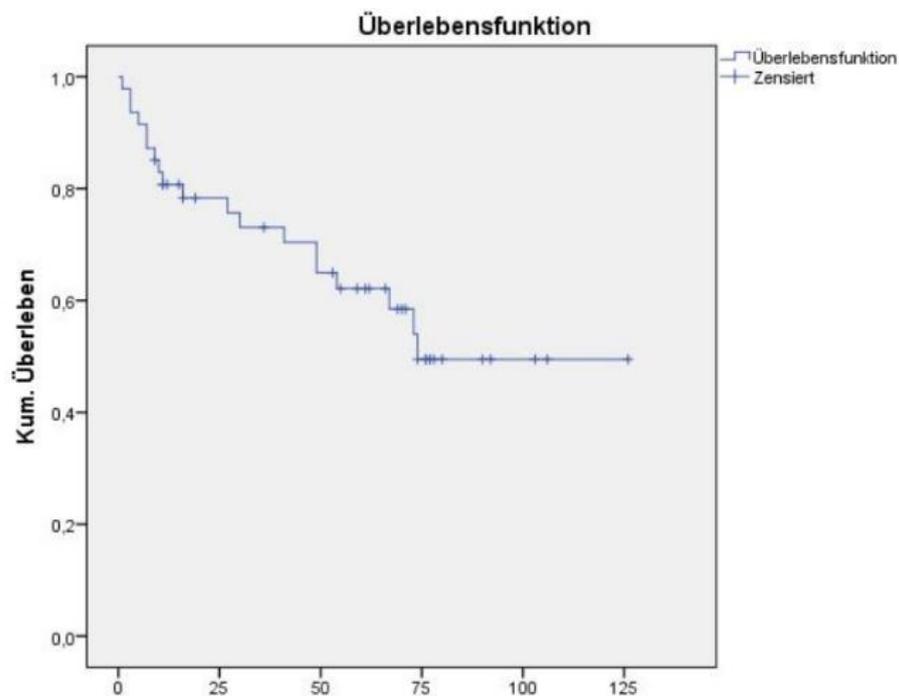


Abbildung 1 Gesamt Überleben der EBV+ DLBCL NOS Kohorte nach Kaplan Meyer

3.3. Whole Genome Sequencing (WGS)

Bei der Analyse der Gesamtmutationslast zeigten sich in unserer Kohorte vergleichbare Ergebnisse zu bereits durchgeführten Analysen des DLBCL im Rahmen des von TCGA (The Cancer Genome Atlas Programm des US National institute of health) die in Abbildung 2 dargestellt sind.

Hierbei zeigten sich 89 exonische, somatische Mutationen (Median 69). Daraus resultierend zeigte sich eine eher durchschnittliche niedrige Mutationslast von 2,318 Mutationen/Megabase/Probe. Darunter fanden sich 675 SNV, 39 Insertionen bzw. Deletionen sowie 132 Splice Site Varianten.

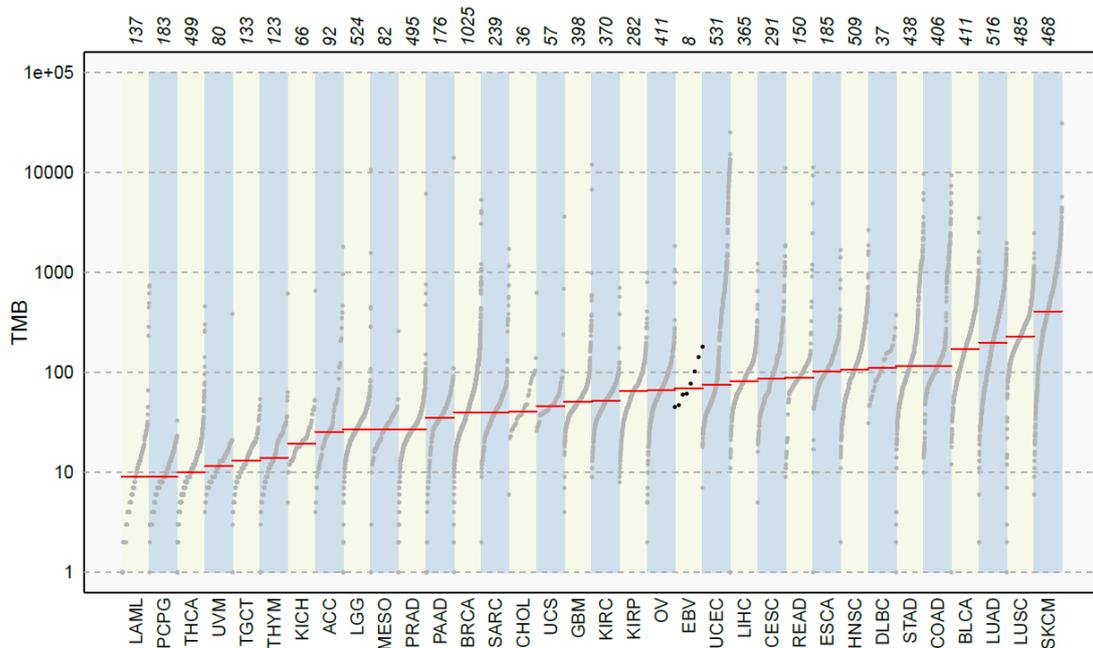


Abbildung 2 Mutationslast in ausgewählten Neoplasien

Legende: Y Achse Mutationen pro Megabase, obere Zeile n der jeweiligen untersuchten Tumore. Unsere EBV+ DLBCL Kohorte ist unter **EBV** aufgetragen,

X-Achse Tumorentität: PCPG: Phäochromozytom, Paragangliom THCA: Schilddrüsen Karzinom ; UVM: Uveamelanom; LAML: akute myeloische Leukämie, TGCT: ; THYM: Thymom; KICH: chromophobes Nierenzellkarzinom; PRAD: Prostatakarzinom; ACC: Nebennierenkarzinom, MESO: Mesotheliom; LGG: Low grade glioma, PAAD: Pankreaskarzinom, CHOL: Gallengangskarzinom, BRCA: Brustkrebs; SARC: Sarkome; UCS: Uteruscarcinomsarcom, GBM: Glioblastom; KIRC: renales Klarzellsarkom; KIRP: renales Papillarzell Sarkom; OV: Ovarial Tumoren, **EBV: DLBCL EBV+ NOS**, UCEC: Endometriom Karzinom; LIHC: hepatozelluläres Karzinom; CESC: Cervix Karzinom; READ: Rektumkarzinom; HNSC: Kopf und Hals Plattenepithelkarzinome; ESCA: Ösophaguskarzinom; STAD: Magenkarzinom; DLBC: diffus lymphoides B-Zell Lymphom; COAD: Kolonkarzinom; BLCA: Blasenkarzinom; LUAD: Adenokarzinom der Lunge; LUSC: Plattenepithelkarzinom der Lunge, SKCM: malignes Melanom

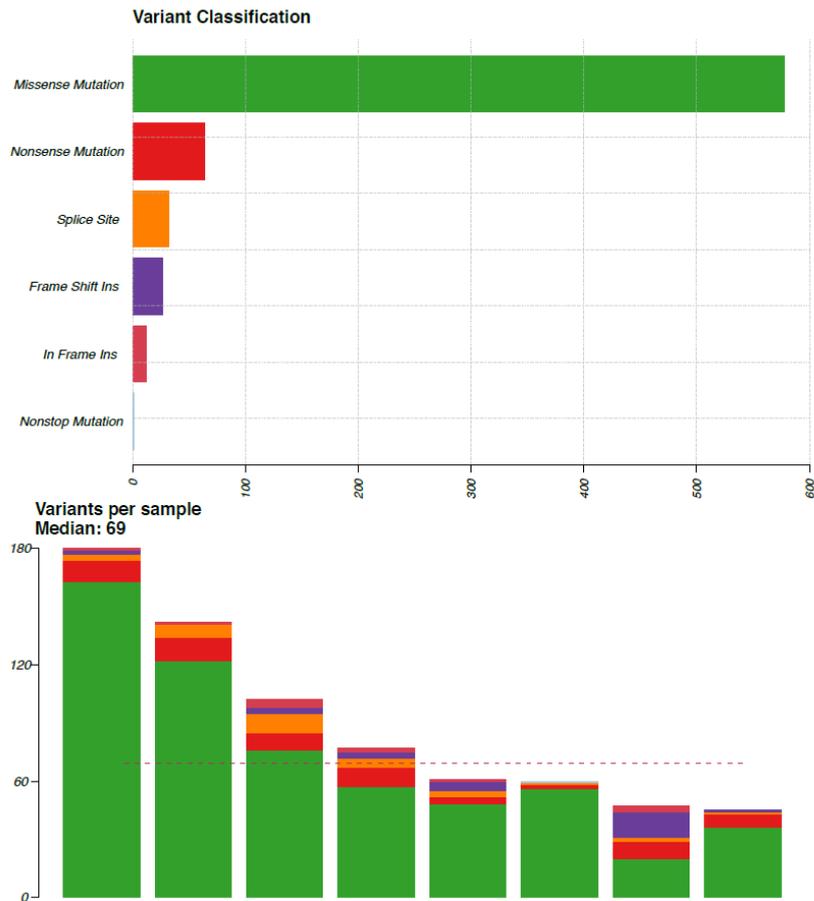


Abbildung 3 Verteilung der Mutationstypen im WGS

Die in Abbildung 3 dargestellten Mutationstypen zeigen, analog zu den Panel Daten, einen überwiegenden Anteil von missense Mutationen über alle veränderten Gene hinweg. In Abbildung 4 werden die Verluste und Hinzugewinne genetischen Materials dargestellt. Dabei konnten an mehreren Chromosomenloci rekurrente Verluste nachgewiesen werden. Darunter fanden sich je zwei Verluste auf Chromosom 1p35 und 1p34, die bisher aber eher im Rahmen von Adenokarzinomen aber auch bei 1p34 für DLBCL beschrieben wurden [12, 6]. Weiterhin zeigten sich auf Chromosom 9p24 eine Amplifikation sowie drei Verluste genetischen Materials. Für die Amplifikation sind hier bereits Beschreibungen bei primär mediastinalen, großzelligen B-Zell Lymphomen und Hodgkin Lymphomen vom nodulär sklerosierenden Typ vorhanden [72]. Für die 17p Position konnte in zwei Fällen eine Deletion unterschiedlichen Ausmaßes nachgewiesen werden. Diese Veränderung lässt sich u.a. bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien vor allem aber NHL nachweisen und ihr onkogenetischer Einfluss beruht auf einer Deletion unterschiedlichen Ausmaßes von *TP53*

[7]. Bezüglich der Häufung an 6q Verlusten in unserer Kohorte werden diese Ergebnisse gesondert dargestellt.



Abbildung 4 CNV mit Verlust (orange) und Hinzugewinn (blau) genetischen Materials sowie Verlust der Heterozygotie (lila) auf den einzelnen Chromosomen mit relativer Lage

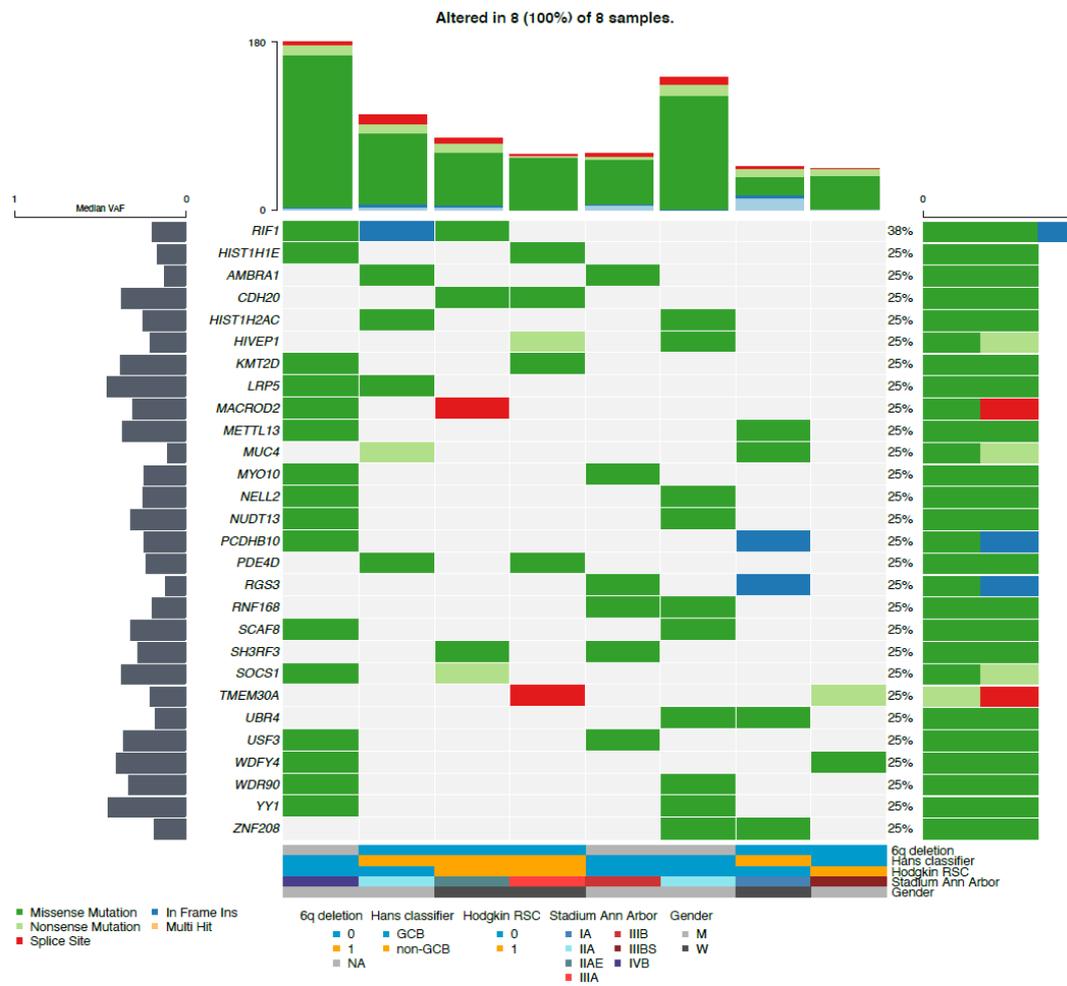


Abbildung 5 Whole Genome Sequencing mit den häufigsten Mutationen (mindestens 2 Mutationen in der WGS Kohorte)

Im WGS zeigten sich in den oben dargestellten Genen am häufigsten Mutationen. Hier konnten Veränderungen bei jeweils 2/8 bis maximal 3/8 Lymphomen nachgewiesen werden. Alle anderen Mutationen fanden sich singularär bei jeweils einer Probe.

3.4. Mutationssignifikanz und Abgleich der Mutationen mit verwandten Entitäten

Im Folgenden werden die im WGS detektierten Veränderungen in einem bioinformatischen Algorithmus hinsichtlich ihrer Signifikanz dargestellt (d.h. Wahrscheinlichkeit für eine relevante Mutation nach Abgleich mit dem normalen Hintergrundrisiko für Mutationen). Übersteigt dieser in einer Kohorte an z.B. Tumorproben einen bestimmten Schwellenwert wird die Mutation als signifikant ausgegeben). Die mutierten Gene mit $p < 0,05$ sind in Abb. 6 dargestellt. Im Anschluss werden die so detektierten Veränderungen dann mit Referenzdatenbanken (in diesem Falle MutSicqCV) abgeglichen und die betroffenen Signalwege in Bezug auf ihre Funktion in der Zelle dargestellt.

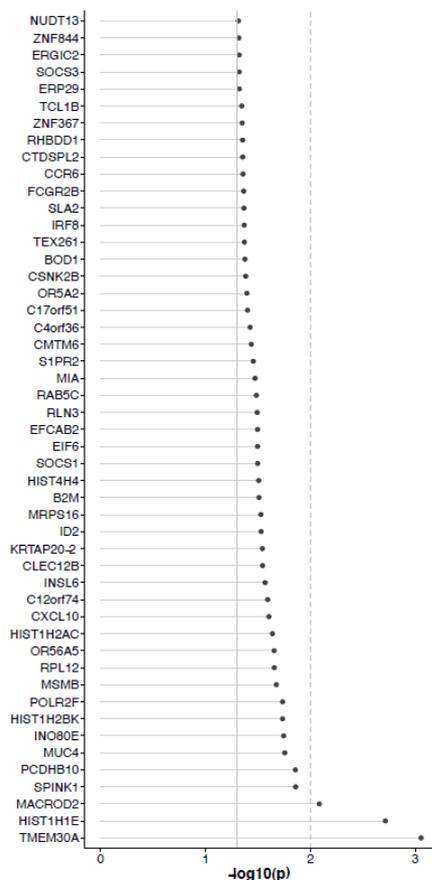


Abbildung 6 Signifikant mutierte Gene in der WGS EBV+ DLBCL NOS Kohorte

3.5. Panelsequenzierung (*targeted next generation sequencing*)

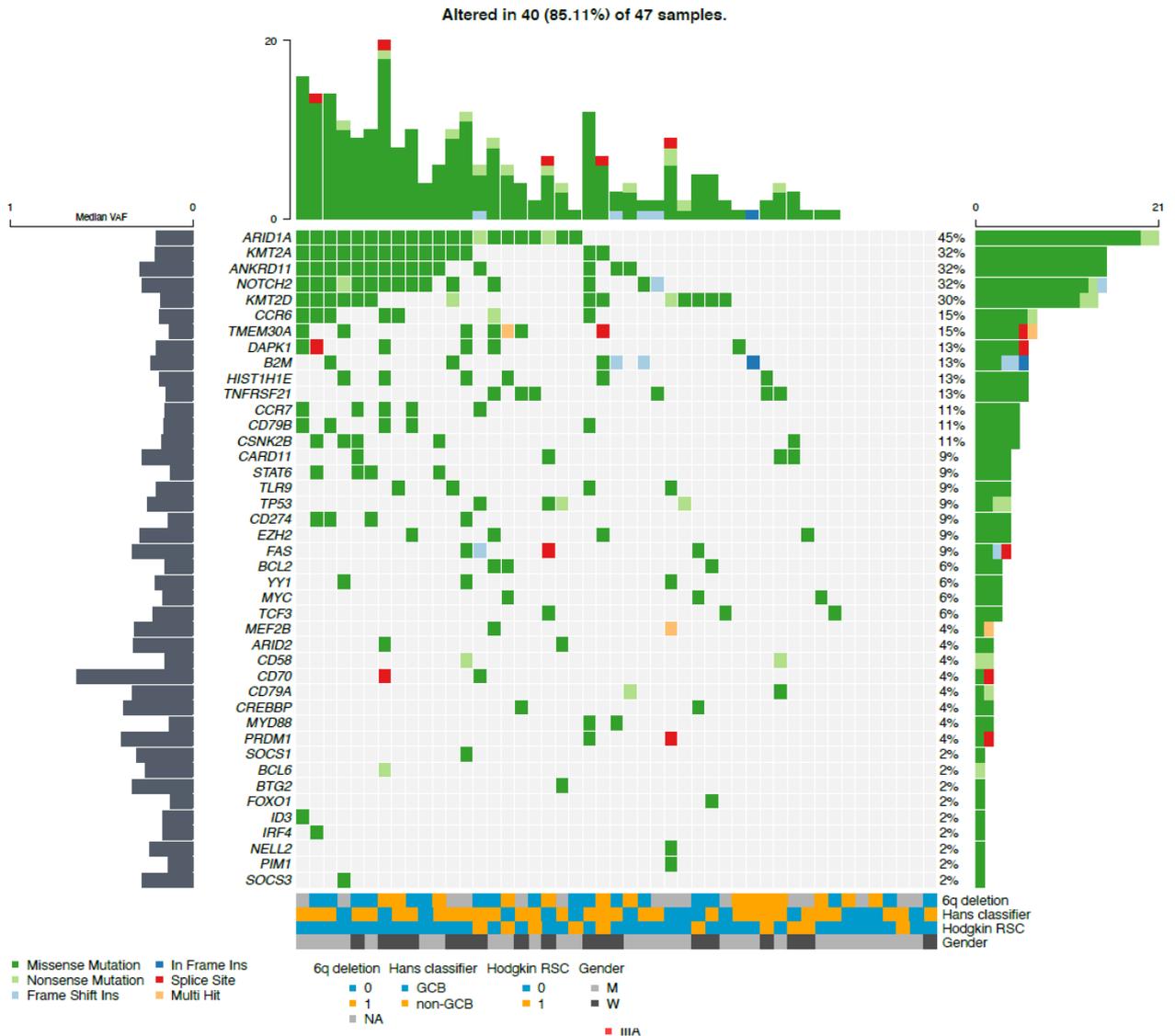


Abbildung 7 Mutationen im targeted next generation sequencing (NGS Panel)

Im *targeted next generation sequencing* wurden die in Abbildung 11 dargestellten genetischen Aberrationen in 42 von 43 Genen bei den 40/47 untersuchten DLBCL EBV+ Tumorproben gefunden. Es zeigten sich 255 Mutationen mit insgesamt im Median 4 Mutationen pro Probe, davon 250 SNV und 5 Insertionen/Deletionen. Dabei zeigten sich die am häufigsten mutierten Gene mit *ARID1A* (45 %), *KMT2A* (32 %) *ANKRD11* (32 %), *NOTCH 2* (32%), *KMT2D* (30 %).

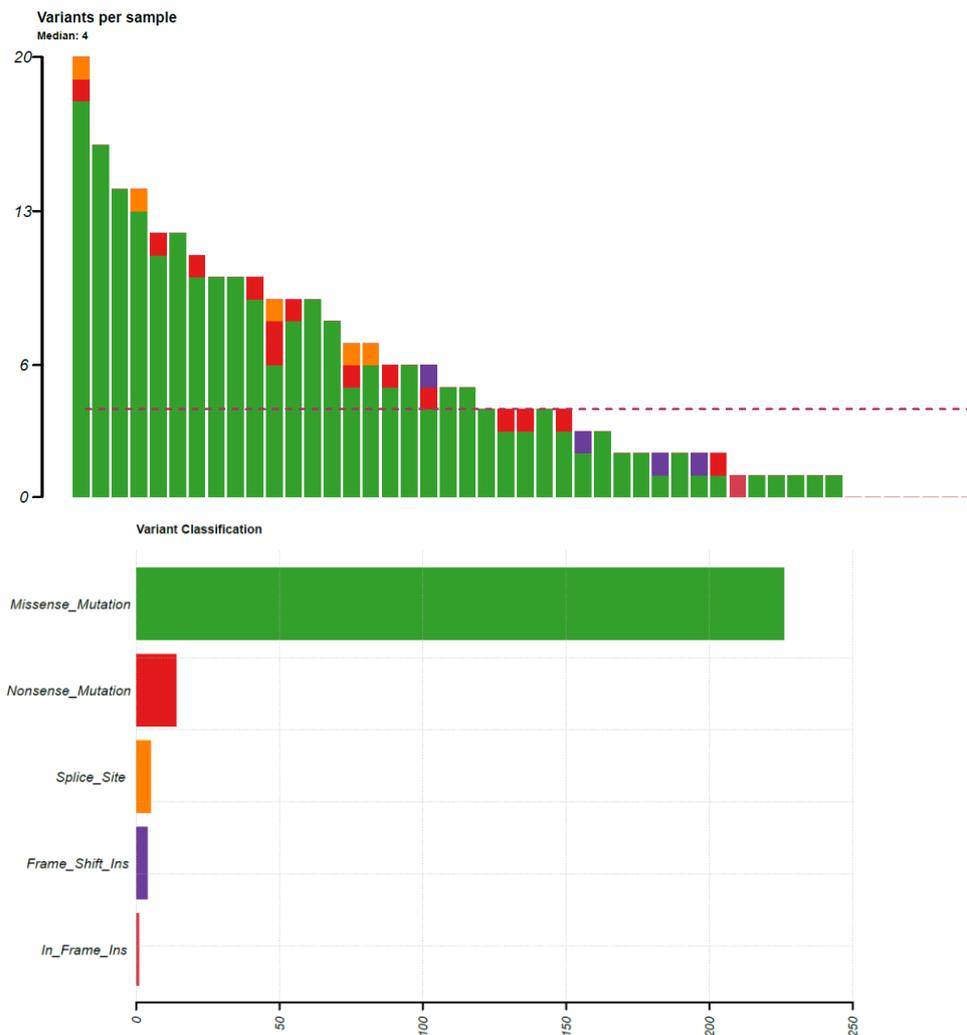


Abbildung 8 Mutationstypen und Mutationshäufigkeit im NGS Panel

Die in Abbildung 12 dargestellten Mutationstypen zeigen eine deutliche Verteilung zu Gunsten von *missense* Mutationen gefolgt von *nonsense* und *splice-site* Mutationen sowie Indels (Insertionen/Deletionen) über alle Patienten hinweg. Vergleicht man die Mutationslast, zeigen sich bei den Fällen vom Keimzentrumstyp (n16) im Mittel 3,5 mutierte Gene und bei den nicht Keimzentrumstyp Lymphomen (n31) im Mittel 4,6 Mutationen.

3.6. Validierung der Whole Genome Sequencing (WGS) Daten im Panel

Vergleicht man den Nachweis von Mutationen in einzelnen Genen im WGS mit denen im Panel, so ergibt sich für unsere EBV+ DLBCL Kohorte folgendes Bild. Für Gene mit einer Mutationsfrequenz von >10% konnte eine Konkordanzrate von 84% (21/25) gezeigt werden.

3.7. Abgleich der häufigsten onkogenen Mutationen mit verwandten DLBCL

Integrierte Analyse der WGS und Panelsequenzierungsdaten

In der erweiterten vergleichenden Analyse der Gene aus der MutSigCV Datenbank konnten wir darstellen, inwieweit sich die gefundenen genetische Aberrationen in Kandidatengenen für die Onkogenese auch bei verwandten Entitäten nachweisen lassen. Hierfür wurden in der Analyse *de novo* DLBCL (alle Typen) und ABC DLBCL berücksichtigt. Übereinstimmend zu früheren Berichten konnten wiederholte Mutationen bei *ARID1A* (45%), *KMT2A* (32%), *ANKRD11* (32%), *NOTCH2* (32%) und *KMT2D* (30%) in unserer EBV+ DLBCL (NOS) Kohorte nachgewiesen werden. Hier zeigten sich aber in einzelnen Genen zum Teil mehr Mutationen im Vergleich zum EBV negativen DLBCL. In der kombinierten Analyse aus WGS und Panelsequenzierung konnten, in Abgrenzung zu bisherigen publizierten Mutationen bei anderen DLBCL Entitäten, Mutationen in *CCR6* (15%), *DAPK1* (15%), *TNFRSF21* (13%) und *CCR7* (11%) als EBV+ DLBCL NOS-spezifisch nachgewiesen werden.

Weitere Gene mit gehäuften Mutationen, die als onkogenetisch relevante Mutationen eine wichtige Rolle spielen, waren *YY1*, *SOCS3*, *NELL2*, *DAPK1* und *CSNK2B*.

Hier zeigten sich in unseren Daten Gemeinsamkeiten mit der von Sarkozy *et al.* veröffentlichten polymorphen EBV+ DLBCL NOS Kohorte bezogen auf onkogene Mutationen bei *SOCS1*, *STAT6* and *KMT2D* sowie Unterschiede bezogen auf Mutationsfrequenzen bei *GNAI3*, *CSF2RB*, *CSMD3*, *CD58* und *PRKDC* [17].

Für die im *targeted sequencing* am häufigsten mutierten Gene in unserer Kohorte konnten Übereinstimmungen mit den anderen Entitäten von *KMT2A*, *NOTCH2* und *KMT2D* gefunden werden (Vgl Abb. 7)

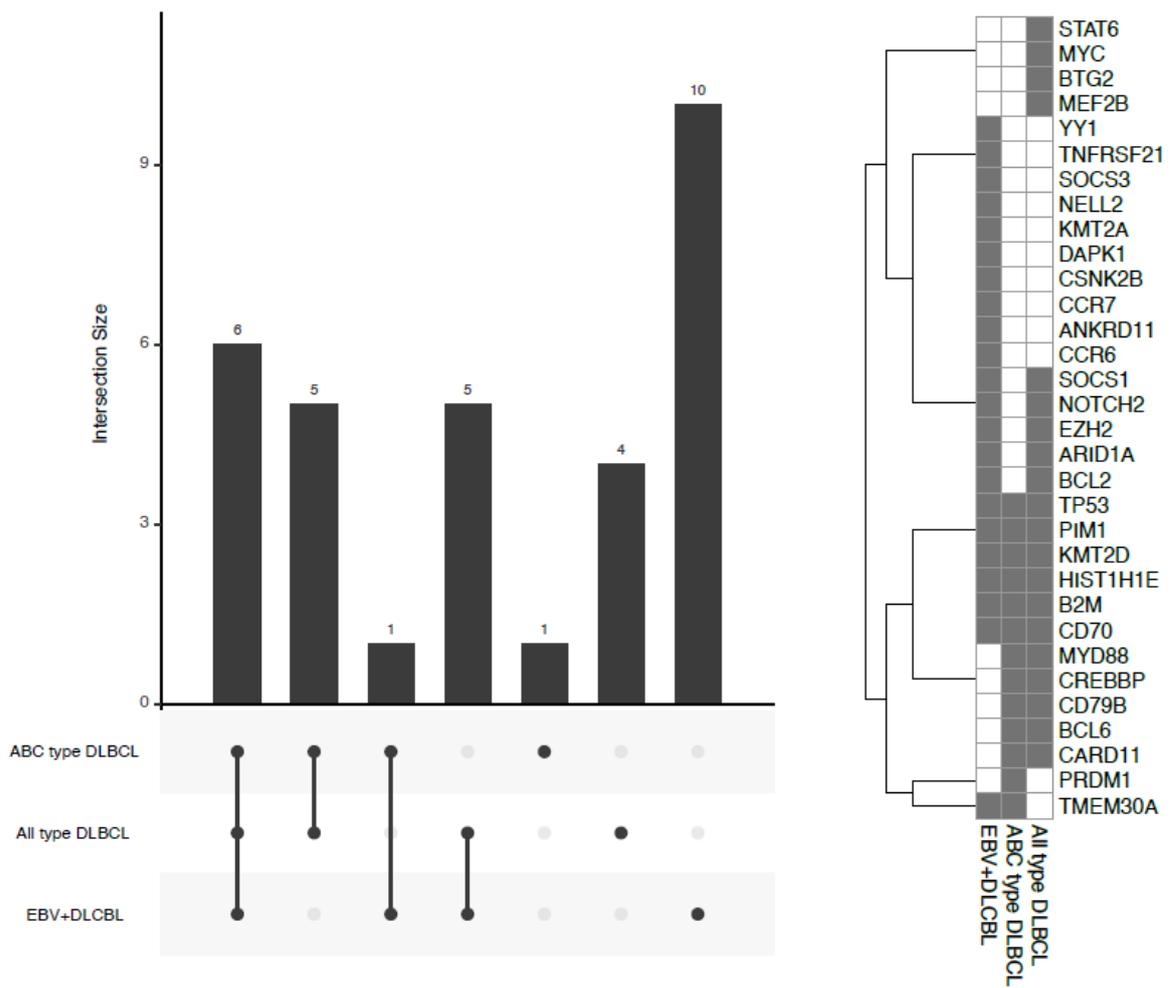


Abbildung 9 Übereinstimmungen von Mutationen bei verschiedenen DLBCL und unserer EBV+ DLBCL NOS Kohorte

3.8. Auswirkungen der Mutationen bzw. von Mutationen betroffenen Signalwege auf den Zellstoffwechsel

In unserer Kohorte zeigte sich ein Überwiegen an Mutationen im Bereich immunologischer Prozesse, inklusive Alpha- und Gammainterferonantwort, Allograft-Abstoßung und der IL6/JAK/STAT3 Signalwege. Weiterhin konnte in derselben Analyse gezeigt werden, dass metabolisch wichtige Zellprozesse wie oxydative Phosphorylierung und Fettsäureoxidation von onkogenen Mutationen ausgenommen sind.

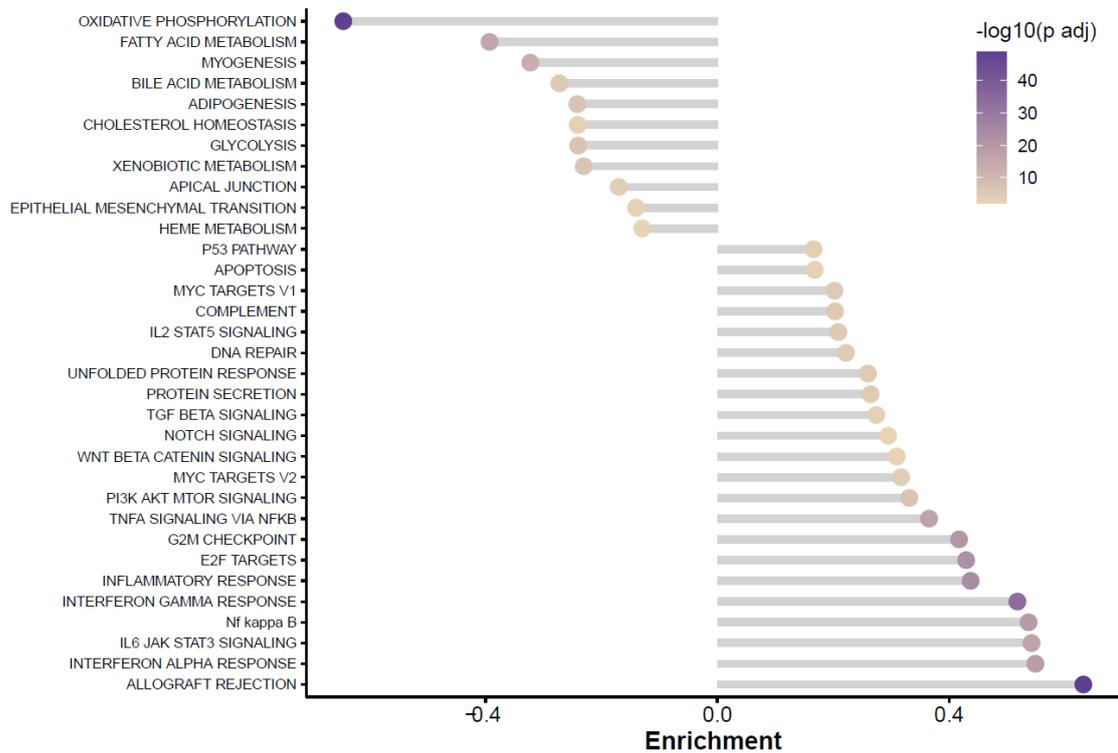


Abbildung 10 Anreicherung bzw. Verminderung von Mutationen in bestimmten Stoffwechsel bzw. Signalwegen

Überträgt man die betroffenen zusammengehörigen Gene in den Kontext der jeweils abgeleiteten Signalwege ergibt sich ein klareres Bild mit Schwerpunkt von NFκB (4/8, 50%), WNT (4/8, 50%) und IL 6 JAK/STAT (3/8, 38%).

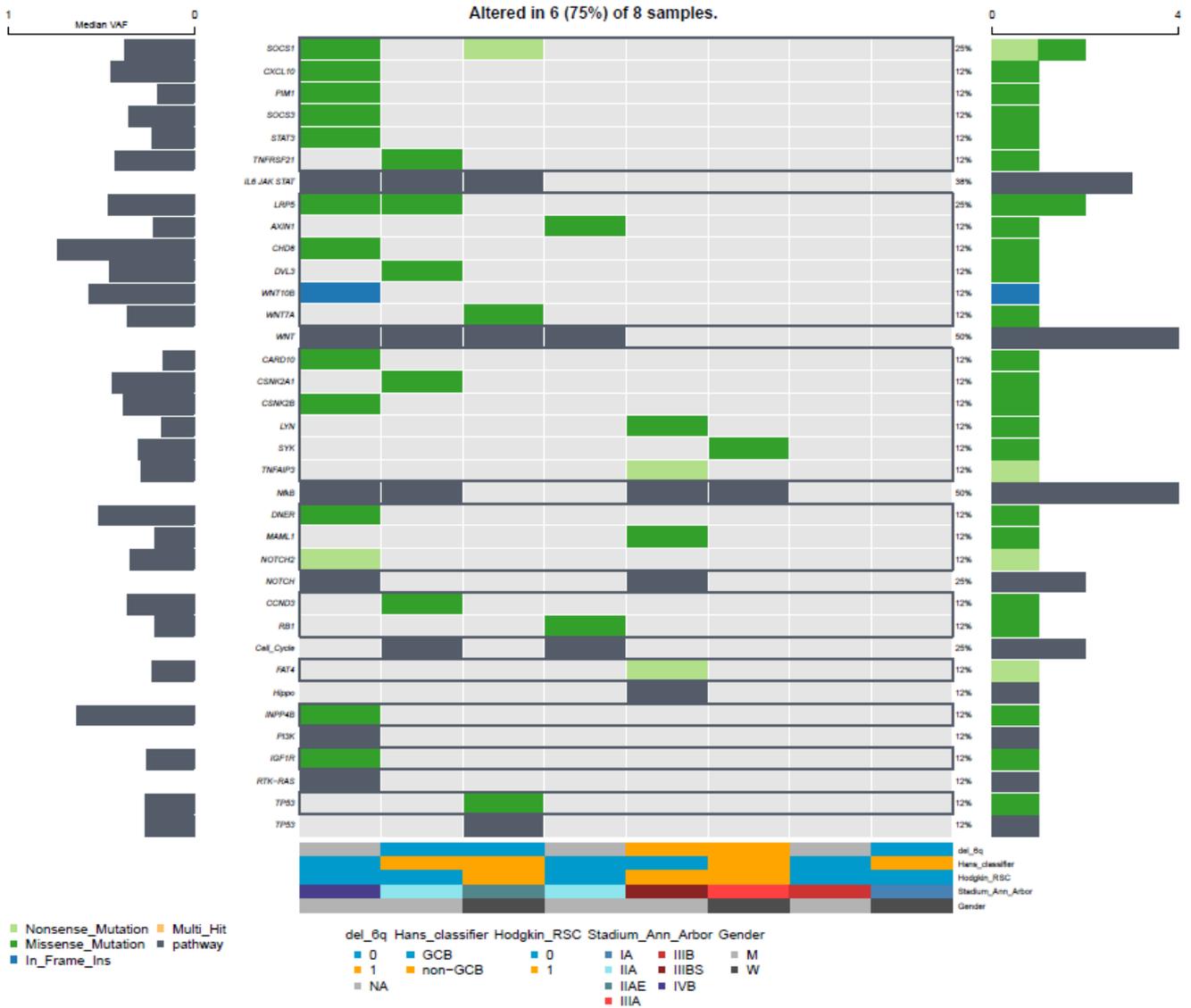


Abbildung 11 Ausgewählte veränderte Signalwege im WGS

Für ausgewählte Gene sind im Folgenden, im Format eines Lollipop Plots, die Lokalisation der einzelnen Varianten im entsprechenden Gen dargestellt. Treten gleiche Mutationen in der Kohorte mehrfach auf, kann dies anhand der Höhe der Markierung abgelesen werden. Die relative Lage der Mutation ist auf der X Achse einzusehen.

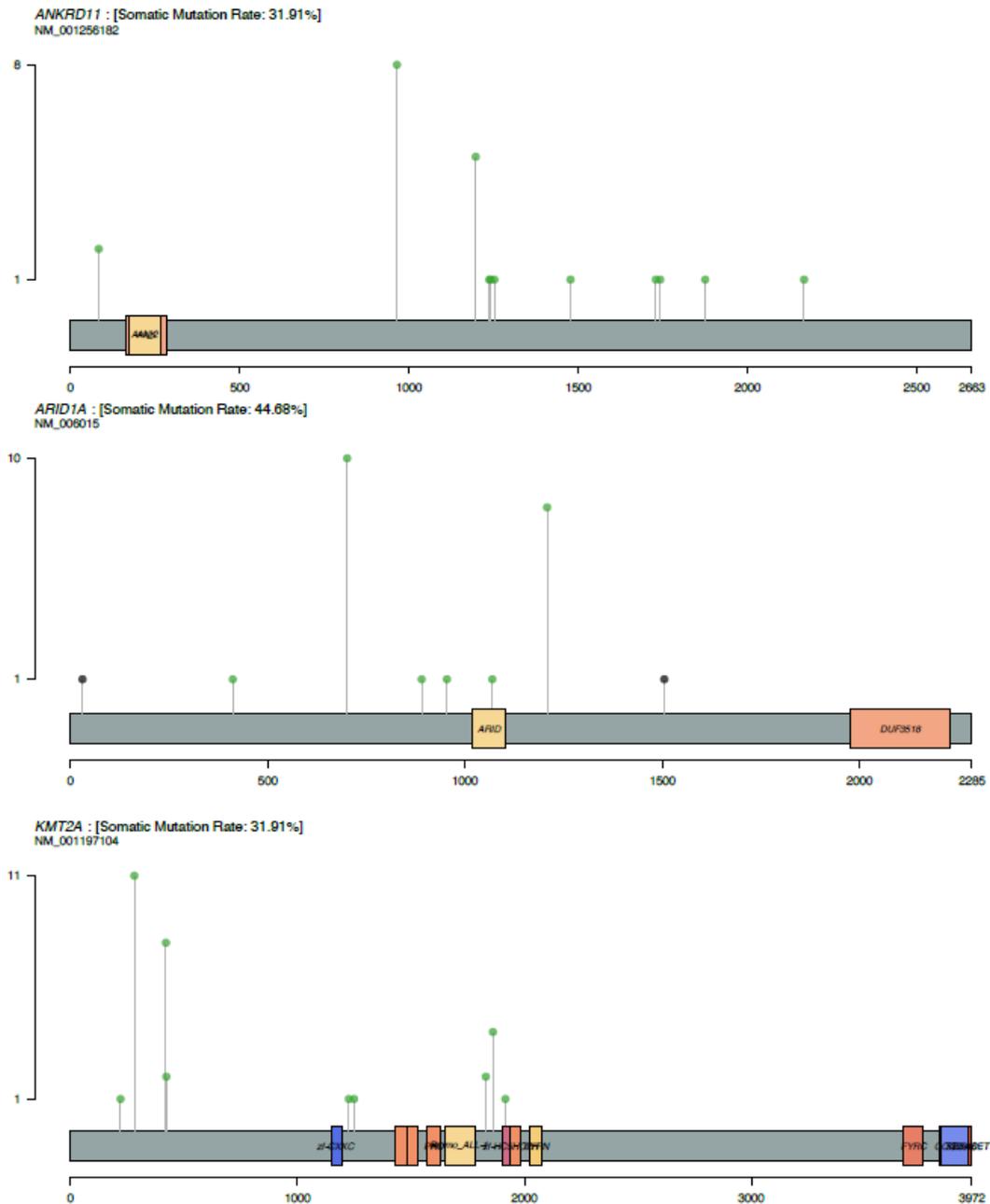


Abbildung 12 Lollipop Plot ausgewählter Gene

3.9. 6q Deletionen sind ein wiederkehrendes Merkmal von DLBCL+ NOS

Von den im WGS identifizierten CNV konnte bei (5/8) Fällen eine 6 q Deletion unterschiedlichen Ausmaßes identifiziert werden, die in fast allen Fällen die für die Lymphomgenese wichtigen *PRDM1* und *A20* Gene umfasste (Abb 14). Damit fallen die inhibierende Komponente von *A20* auf den NF κ -B Signalweg weg, was zur Lymphomgenese beitragen könnte. Aus der gesamten Kohorte konnten, abhängig von verfügbarem Gewebe (32/47) die FISH Diagnostik für einen 6qVerlust durchgeführt werden (Abb. 15). Hier konnte die 6q Deletion bei allen Fällen mit verfügbaren Gewebsschnitten beim WGS mit 100% bestätigt werden. Auf die Gesamtkohorte bezogen, wurden bei 14/32 (44%) der 6q Verlust nachgewiesen. In der Gruppe von EBV+ DLBCL NOS mit 6q Deletion zeigte sich weiterhin eine deutlich niedrigere Mutationsfrequenz von *KMT2D* und *NOTCH2* (Abb. 14).

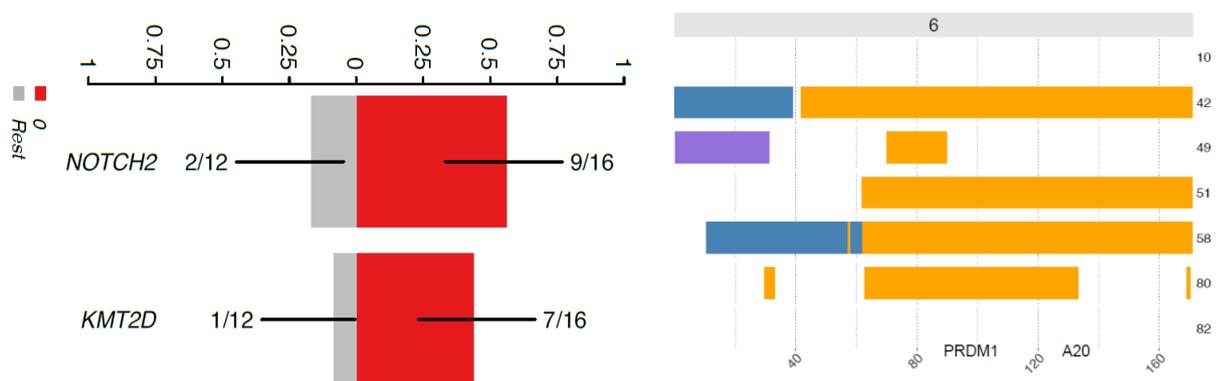


Abbildung 13 Mutationsfrequenz *KMT2D* und *NOTCH2* bei 6q Deletion; Detail CNV Chr. 6 im WGS

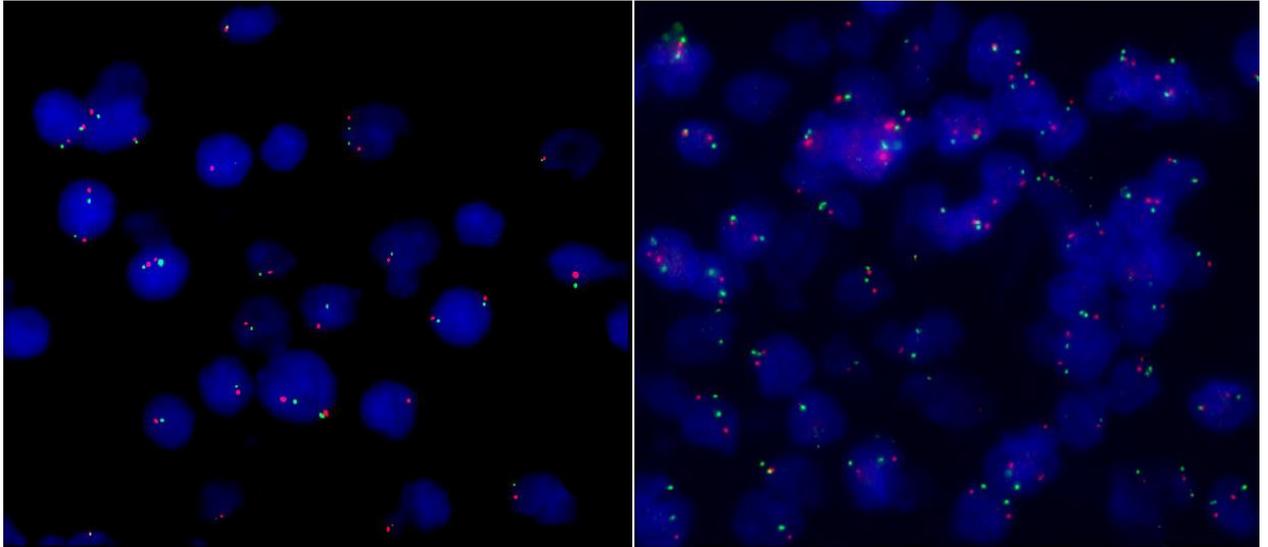


Abbildung 14 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung mit 6q Sonde, links Deletion, rechts Wildtyp ohne Deletion, Vergrößerung 1000fach

3.10. Auswirkungen auf das Gesamtüberleben

Keines der 5 am häufigsten mutierten Gene aus dem Panel ist mit Einfluss auf das Gesamtüberleben assoziiert ($p > 0.05$). Jedoch sind Mutationen in *ANKRD1* mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv assoziiert ($p = 0.04$, Abb.16). In der Analyse ob Kombinationen aus mutierten Genen das Überleben beeinflussen, zeigt sich die Kombination aus Mutationen in *ARID1A* und *DAPK1* mit einem geringeren Überleben assoziiert ($p = 0.0415$) (Abb 17), für das progressionsfreie Überleben verfehlte dieses Mutationsmuster jedoch das prädefinierte Signifikanzniveau. Für die Rezidivprognose fand sich hier für keine Kombination ein signifikanter Einfluss.

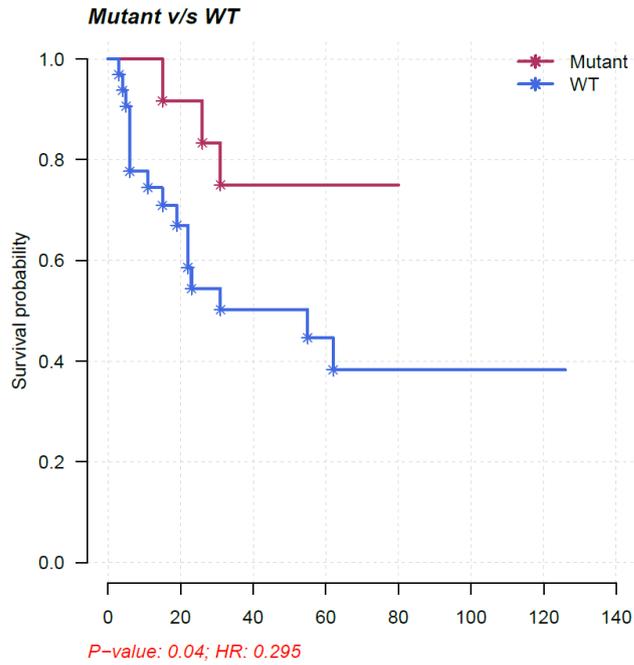


Abbildung 15 ANKRD11, Mutation vs. Wildtyp

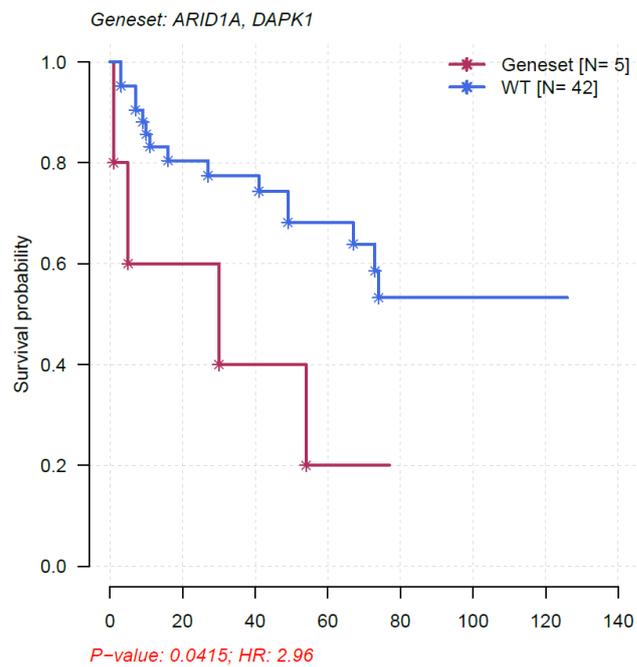


Abbildung 16 Überleben bei kombinierter Mutation von ARID1A und DAPK1, vs. Wildtyp

4. Diskussion

Unsere Studie über die genetischen Veränderungen bei EBV+ DLBCL NOS wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine seltene Untergruppe der DLBCL näher zu charakterisieren, um die Grundlagen für eine verbesserte Behandlung einer eher älteren Patientenkohorte zu legen. Bei dieser lässt sich mit der herkömmlichen Behandlung mit limitierten Therapieoptionen bislang nur ein mäßiger Therapieerfolg erzielen. Einem integrativen Ansatz für somatische Mutationsanalyse von Tumorproben folgend, konnten wir so die bislang größte EBV+ DLBCL NOS Kohorte untersuchen. Mittels dieser Kombination aus WGS (*whole genome sequencing*) und *targeted next generation sequencing* konnten die für die Gesamtgruppe der DLBCL bislang publizierte Mutationslast bestätigt werden, wobei in TCGA Daten nicht nach EBV Positivität selektiert wird [111]. Übereinstimmend mit früheren Publikationen konnten wir bestätigen, dass die Mutationsfrequenz in unserer EBV+ DLBCL NOS Kohorte niedriger als bei vergleichbaren EBV negativen DLBCL ist. Erklärbar könnte diese Beobachtung im Rahmen der EBV induzierten Onkogenese sein. So wären in der EBV infizierten Zelle weniger Mutationen notwendig, um eine maligne Entartung zu provozieren und trotzdem eine ähnlichen DLBCL Phänotyp zu generieren. Diese Beobachtung deckt sich mit der bisherigen Literatur für EBV+ Burkitt Lymphome, bei denen, analog zu unserer Kohorte deutlich weniger onkogene Mutationen nachgewiesen wurden [71].

Mehrere wiederkehrende genetische Alterationen wurden sowohl im IL6/JAK/STAT als auch im NF κ -B Signalweg beschrieben. Damit konnten in Teilen bereits von Sarkozy und Zhou vorbeschriebene Mutationsmuster von onkogenen Mutationen bei *KMT2D*, *CD58*, *BCL6* und *NOTCH2* reproduziert werden [149, 124]. An dieser Stelle sollte aber beachtet werden, dass die Resultate unserer europäischen Patientenkohorte nicht ohne weiteres auf die von Zhou *et. al.* publizierte asiatische übertragen lässt und umgekehrt. Ergänzend muss hier auch die nicht keimbahnkontrollierte Methodik mittels *whole exome sequencing* genannt werden, die in der zitierten Studie Anwendung fand [149]. Weiterhin bestehen hier methodische Unterschiede bezüglich des Patienteneinschlusses, da in der Studie von Sarkozy *et. al.* ausschließlich polymorphe EBV+ DLBCL NOS analysiert wurden [17, 98]. Unsere Kohorte deckt hier mit dem Einschluss monomorpher und polymorpher EBV+ DLBCL NOS ein deutlich breiteres Spektrum der Entität ab (histologisches Kriterium von Reed Sternberg Zellen beim polymorphen Typ). Vorbeschriebene Mutationen in *TET2* und *TNFRSF14* konnten in unserer WGS Kohorte nicht in relevanter Anzahl nachgewiesen

werden. Im Paneldesign waren entsprechende Gene nicht berücksichtigt, daher kann für die *targeted sequencing* Kohorte keine entsprechende Aussage getroffen werden.

Die vorliegende Studie kann nun, zusätzlich zur großen Patientenkohorte, durch die Kombination von keimbahnkontrolliertem WGS, Tumor WGS und *targeted next generation sequencing* eine deutliche Erweiterung des Wissens über die Mutationsmuster von EBV+ DLBCL NOS liefern. Vor allem durch die o.g. Kombination lässt sich das heterogene Mutationsbild dieser Entität besser erfassen als durch Ansätze, die sich auf somatische (Tumor) Exondiagnostik beschränken.

Weiterhin konnten wir die Beobachtung von Liu et al. bestätigen, die bisher nur bei einer kleineren Kohorte mit ausschließlicher Tumor *whole exome* Analyse gemacht wurde, dass bei EBV+ DLBCL NOS ein eher heterogenes Mutationsmuster mit nur wenigen wiederkehrenden Mutationen vorliegt [98].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EBV+ DLBCL zusätzlich Mutationen in *CCR6 CCR7, DAPK1, TNFRSF21, CSNK2B* sowie *YY1* besitzen.

Vorausgehende Arbeiten, die sich mit der Rolle von *CCR6* bei Neoplasien, insbesondere MALT Lymphomen, beschäftigten, konnten zeigen, dass Mutationen eine defekte β -Arrestin vermittelte Rezeptor Desensibilisierung und Internalisierung verursachen. Hier wird vermutet, dass damit die Herabregulation von Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von extra- nach intrazellulär deutlich beeinträchtigt wird [107]. In weiteren Studien wurde eine Dysregulation der *CCL20/CCR6* Achse nicht nur bei Inflammation und Infektion, sondern auch bei einer Vielzahl von Neoplasien wie pankreatischem, kolorektalem, hepatozellulärem Karzinom und Mammakarzinom diskutiert [83].

Die *CCR7* Induktion in EBV infizierten Zellen wurde zuletzt als Faktor diskutiert, der es lymphatischen Zellen ermöglicht, sich in sekundären lymphatischen Organen niederzulassen. Dieses Phänomen, das zum normalen Lebensweg von Lymphozyten gehört, wird auch als „*homing*“ bezeichnet. Sind die Lymphozyten dann in der Folge gewebsständig, kann die EBV Infizierte Zelle, je nach Latenzmuster dann weitere Zellen infizieren bzw. die weitere Lymphomgenese begünstigen [88].

Die Rolle von *CCR7* beim EBV+ DLBCL bleibt bislang wenig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Rezeptor Zellproliferation und Migration auch bei Neoplasien

vermittelt. Für Mammakarzinome wurde dieser Weg bereits beschrieben, jedoch ist der exakte Mechanismus noch nicht vollständig geklärt [122].

Weiterhin konnten wir onkogene Mutationen in *DAPK1* als Charakteristikum von EBV+ DLBCL NOS nachweisen. Als regulatorischer Partner von *TP53* konnte für *DAPK1* ein Funktionsausfall, vermutlich durch Hypermethylierung, als Prediktor für eine schlechtere Prognose bei DLBCL gezeigt werden [89]. Neben epigenetischen Aspekten, wie in der zitierten Arbeit, können auch direkte Mutationen wie in der vorliegenden Arbeit, einen Funktionsverlust von *DAPK1* bedingen.

Für *TNFRSF21/DR6* finden sich Studienergebnisse, die bei Beeinträchtigung bzw. Funktionsausfall eine erhöhte Zellproliferation und eine herabgesetzte Apoptoserate bei B- und T-Zell Neoplasien, inklusive angioimmunoblastischer T-Zell Lymphome, nachweisen. Letzteres stellt eine weitere Neoplasie dar, bei der eine EBV Infektion gehäuft als Treiber der Onkogenese fungiert [125, 21, 140].

Ein weiteres bekanntes Treibergen der Onkogenese ist *YY1*. Unabhängig vom EBV Status wurde bei DLBCL für *YY1* eine Assoziation zwischen Überexpression und konsekutiver, maligner B-Zell Transformation und Tumorprogression beschrieben [13]. *CSNK2B* Mutationen, die in unserer Studie exklusiv bei EBV+ DLBCL NOS auftraten, sind bislang nur unzureichend charakterisiert. Eine mögliche Rolle könnte hier der Einfluss auf die *TP53* Aktivität spielen, zu deren Regulatoren bzw. Einflussfaktoren *CSNK2B* zählt [60]. Bei adulten T-Zell Leukämien konnten ebenfalls *CSNK2B* Mutationen nachgewiesen werden [85].

Mit den oben genannten Mutationen konnte das Verständnis des Mutationsmusters von EBV+ DLBCL NOS deutlich erweitert werden. Mit der Beschreibung der bislang z.T. unbekannt, genetischen Veränderungen dieser seltenen Entität können gegebenenfalls neue Therapieansätze entwickelt werden. Zuvor bedarf es allerdings einer funktionellen Validierung der pathophysiologischen Relevanz der identifizierten Alterationen, was gleichzeitig im Rahmen nachfolgend geplanter Projekte neue Tore zur pharmakoonkologischen Forschung öffnen wird.

Aufbauend auf Studienresultaten unter Verwendung von Array CGH Analysen aus unserer Arbeitsgruppe, konnten auch in dieser Kohorte gehäufte 6q Deletionen nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse aus dem WGS mit Analyse der CNV in Kombination mit der

Validierung dieser Ergebnisse via FISH stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass beim ABC-DLBCL ebenfalls gehäuft 6 q Deletionen auftreten. Diese umfassen regelhaft sowohl *PRDMI* als auch *A20* und stellen neben einer pathophysiologischen Erklärung der Genese des präterminal differenzierten B-Zell Phänotypen der Erkrankung (durch Verlust der Expression der o.g. Gene) einen adversen Prognosefaktor dar [144]. Phänotypisch passt dazu der post-germinale Typ der EBV+ DLBCL NOS, so dass die 6q Deletion hier ein entscheidender Treiber der Onkogenese zu sein scheint.

Auffällig ist ebenfalls, dass in unserer Kohorte Fälle mit 6q Deletion signifikant weniger Mutationen in Treibergenen wie *ANKRD11* und *NOTCH2* aufwiesen. So scheinen bei diesen Fällen weniger zusätzliche genetische Mutationsereignisse zur Lymphomentstehung notwendig zu sein. Das wiederum kann als weiterer Hinweis auf eine unabhängige Rolle der 6 q Deletion bei der Onkogenese gewertet werden.

Für die Risikostratifizierung bezüglich der 6q Deletion konnten keine statistisch relevanten Auswirkungen auf Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben beobachtet werden. Interessant wäre es, diese Beobachtung an einer größeren Kohorte zu überprüfen, da diese Fälle scheinbar weniger Mutationsereignisse für die Entwicklung eines EBV+ DLBCL brauchen und somit ggf. einer zielgerichteten Therapie besser zugänglich sind. Die teilweise komplexe Interaktion zwischen einzelnen onkogenen Mutationen machen die individuelle Behandlung dieser Patienten für Kliniker und Diagnostiker zunehmend schwierig [94].

Die Integration von klinischen Daten und den aufgedeckten Mutationen unserer EBV+ DLBCL NOS Kohorte, ist naturgemäß aufgrund der Fallzahlen schwierig, da größere Patientengruppen notwendig sind, um verlässlich signifikante Einflüsse aufzudecken.

Dennoch konnten wir für die Kombination aus genetischen Alterationen bei *ARID1A* und *DAPK1* einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben darstellen. Weiterhin konnte bei Mutationen von *ANKRD11* ein besseres rezidivfreies Überleben beobachtet werden. Das Gesamtüberleben blieb davon unbeeinflusst. Um diese Konstellationen ggf. als Prognose Werkzeug bei der Diagnostik von EBV+ DLBCL NOS einzusetzen, wäre aber ein prospektiver Forschungsansatz, vorzugsweise im Rahmen einer klinischen Studie, vonnöten.

4.1. Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit sowie Ausblick auf weitere Projekte

Alle beschriebenen Fälle wurden einem umfassenden hämatopathologischen Assessment mit zytogentischer Aufarbeitung vor Studieninklusion unterzogen. Die untersuchte Kohorte ist, trotz der vergleichsweise seltenen Entität des EBV+ DLBCL NOS, die bis dato Größte dieser Art. Daher kann hier der genetische Hintergrund sehr umfassend und präzise dargestellt werden. Das retrospektive Design unserer Studie ist der Seltenheit dieser Erkrankung geschuldet, jedoch wäre ein prospektiver Ansatz, insbesondere zu Beantwortung klinischer Fragestellung wie Therapieansprechen und Erfolg, sinnvoll. Auch birgt der retrospektive Ansatz das Risiko für einen Datenverlust bei der Erhebung der klinischen Daten sowie einen Selektionsbias. Weiterhin wäre eine größere WGS Kohorte wünschenswert gewesen, um die Ergebnisse dieser Subgruppe unserer Analyse zu stärken. An dieser Stelle sei aber auf die Limitation des vorhandenen Keimbahnmaterials zu den entsprechenden Tumorproben und die, zu Beginn des Projektes noch immens hohen Sequenzierungskosten (ca. 8000 €/Fall) hingewiesen. Insofern können für diese Gruppe nur orientierende Aussagen darüber getroffen werden, ob die neu aufgedeckten Mutationen in ihrer Frequenz repräsentativ für die Gruppe der EBV+ DLBCL NOS sind, wohingegen eine größere WGS Kohorte sicherlich mehr „Mutations-Hotspots“ aufdecken könnte. Hier sind weitere Studien an größeren Kohorten notwendig, um die beschriebenen Ergebnisse aus der WGS Analyse zu validieren. Eine weitere Limitation stellt die eher begrenzte Anzahl an untersuchten Genen unseres Panels im Rahmen der Validierung dar. Allerdings muss hier bei größeren Panelansätzen mit mehr Genen für weitere Forschung diskutiert werden, ob in Anbetracht der deutlich verbesserten Möglichkeiten bei WGS/WES und auch deutlich beschleunigter bzw. preiswerterer Analyse die Zukunft genomischer Forschung in der Onkologie nicht eher den Hochdurchsatz WGS/WES Verfahren gehört.

Weiterhin lässt sich über die Validierung des Whole Genom Sequencing durch die Panel Daten die Eignung dieser Analysemethode auch für zukünftige Forschung bezüglich genetischer Veränderungen bei Neoplasien und insbesondere DLBCL darstellen. *Targeted sequencing* wird seinen Stellenwert aufgrund der hohen Trefferquote für genetische Veränderungen in den untersuchten Genen, aufgrund der hohen Abdeckung im Vergleich zur WGS, nicht verlieren.

Aufgrund der hohen Parallelisierung von DNA-Sequenzierung, die WGS und auch Panel Diagnostik deutlich beschleunigt haben, können hier durch Sequenzierartefakte Fehler entstehen und Eingang in die Ergebnisse von Mutationsanalysen finden. Z.T. lassen sich diese über Datenmanagement, bioinformatische Filter und gute Präanalytik ausräumen, es bleiben jedoch immer Artefakte. Eine unabhängige Validierung identifizierter Varianten mittels Sanger Sequenzierung, wie sie in der Vergangenheit noch flächendeckend gebräuchlich war, ist bei der Masse an Daten aus den großen aktuellen WES/WGS Arbeiten mit enormem Zeit- und Kostenaufwand verbunden und birgt auch das Risiko fehlender Nachweise subklonaler Veränderungen.

Weiterhin ist beim WGS aufgrund der methodisch bedingten geringeren Coverage die Sensitivität der Erfassung von Mutationen geringer als bei der Paneldiagnostik. Auch sind durch o.g. bioinformatische Bereinigung der Rohdaten z.B. Verluste von nicht kodierenden DNA-Arealen mit häufiger Wiederholung von Basenfolgen möglich. Die sehr großen Datenmengen machen daher ein stringentes und im Idealfall international standardisiertes Filtern notwendig, da gerade im Bereich des WGS die Durchsicht aller Sequenzierdaten und manueller Abgleich mit vorhandenen Referenzgenomen zeitlich nicht durchführbar ist.

Gleichzeitig muss man einschränkend hinzufügen, dass solche Verfahren mit der Analyse größerer Patientenkohorten bisher eher Forschungsfragen beantworten können und in der direkten klinischen Patientenversorgung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Neben finanziellen Aspekten einer vergleichsweise teuren, personalisierten, onkologischen Behandlung, die durch genetische Analysen z.T. noch deutlich teurer wird, spielt hier auch ein organisatorisch zeitlicher Aspekt eine wichtige Rolle. Nach Probengewinnung und Analyse stellt die Aufarbeitung von WGS Daten zeitlich, bioinformatisch und personell eine große Herausforderung dar. Auch sind Schnittstellenproblematiken zu beachten, die bei der Kommunikation und Interpretation der Befunde zwischen Kliniker und medizinischer Genetik sowie Patienten entstehen, da die Interpretation der Befunde für den Kliniker nicht immer einfach ist. Gleichzeitig klafft eine zunehmende Schere zwischen den verhältnismäßig geringen Kosten für die Diagnostik und Charakterisierung der malignen Erkrankung und den rasch zunehmenden Kosten für gezielte Therapieansätze in späteren Therapielinien. Eine rational getriebene molekulare Stratifizierung kann hier trotz der oben ausgeführten Herausforderungen wirtschaftlich sinnvoll sein.

Die vorliegende Arbeit kann sowohl als Grundlage für weitere funktionelle Forschung als auch für die Entwicklung von *targeted sequencing* Plattformen für die Risikostratifizierung und die Prognoseabschätzung beim EBV+ DLBCL NOS dienen. Damit langfristig Patienten davon profitieren, ist weitere Forschung notwendig. Insbesondere muss hier die Bedeutung der nachgewiesenen Mutationen in Bezug auf zielgerichtete Therapieansätze, vor allem in späteren Therapielinien erfolgen.

Bezüglich der genetischen Heterogenität dieser eigentlich klonalen Erkrankung zeigt sich, dass auch hier innerhalb eines Tumors unterschiedliche Subklone vorliegen können [93, 98], was die Suche nach häufig wiederkehrenden Mutationssignaturen mit möglichem therapeutischen Ziel erschwert.

Für zukünftige Forschungsprojekte könnte die Phänotypisierung der gefundenen genetischen Alterationen eine wichtige Rolle spielen. Hier wurden bereits wichtige Schritte bei Proteomanalysen von DLBCL unternommen [126].

5. Zusammenfassung

In unserer retrospektiven Studie zum genetischen Hintergrund von EBV+ DLBCL NOS an der bislang größten Kohorte dieser Art konnten wir das molekulare Verständnis dieser Entität um wichtige Beobachtungen ergänzen und bereits bekannte Mutationen von verschiedenen DLBCL Entitäten nachweisen.

Der integrierte Ansatz aus keimbahnkorrigiertem WGS mit Validierungskohorte über ein *targeted next generation sequencing panel* ermöglichte uns, in der vorliegenden Arbeit ein umfassendes Bild genetischer Aberrationen dieser seltenen Entität an einer repräsentativen Kohorte zu zeichnen. Ergänzt wurde unsere Analyse durch eine FISH Diagnostik zum Nachweis einer 6q Deletion, die anhand der WGS Daten als rekurrentes und mutmaßlich pathogenetisch relevantes Merkmal des EBV+ DLBCL (NOS) identifiziert werden konnte. Es zeigte sich in der kombinierten Analyse von WGS und Panel Daten die höchste Mutationsfrequenz für die Gene *ARID1A* (45 %), *KMT2A* (32 %), *ANKRD11* (32 %), *NOTCH 2* (32%), *KMT2D* (30 %).

Führt man die Ergebnisse des WGS und der Paneldiagnostik zusammen, zeigen sich weiterhin gehäufte *CCR6*, *CCR7*, *DAPK1* und *TNFRSF21* Mutationen, die eine klare Abgrenzung zum EBV- DLBCL NOS darstellen. Weitere Gene mit gehäuften Mutationen, die als onkogenetische Treibermutationen eine wichtige Rolle spielen, waren *YY1*, *SOCS3*, *NELL2*, *DAPK1* und *CSNK2B*. Eine wichtige ergänzende Beobachtung waren die gehäuft nachgewiesenen 6q Deletionen unserer Kohorte, die mit insgesamt signifikant weniger Mutationen einhergehen. Hier kann vermutet werden, dass die 6 q Deletion, mit Verlust von *PRDM1* und *A20* als wichtige entitätsspezifische, onkogene Aberration gesehen werden muss. Diese Beobachtung bedarf weiterer funktioneller Validierung durch zukünftige Arbeiten. Für die Kombination aus genetischen Alterationen bei *ARID1A* und *DAPK1* konnte ein negativer Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei Mutationen von *ANKRD11* ein besseres Rezidiv-freies Überleben beobachtet werden. Insgesamt war die Kohortengröße für weitere Aussagen bezüglich des klinischen Einflusses einzelner Mutationen noch zu gering.

In Zusammenschau aller Ergebnisse kann postuliert werden, dass die EBV+ DLBCL NOS eine eigenständiges, heterogenes Mutationsmuster besitzen und mit unserer Studie der Grundstein für zukünftige, therapiezentrierte Projekte im Hinblick auf gezielte, molekular stratifizierte Therapieansätze bei dieser seltenen Entität gelegt wurde.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Gesamt Überleben der EBV+ DLBCL NOS Kohorte nach Kaplan Meyer....	31
Abbildung 2 Mutationslast in ausgewählten Neoplasien	32
Abbildung 3 Verteilung der Mutationstypen im WGS	33
Abbildung 4 CNV mit Verlust (orange) und Hinzugewinn (blau) genetischen Materials sowie Verlust der Heterozygotie (lila) auf den einzelnen Chromosomen mit relativer Lage	34
Abbildung 5 Whole Genome Sequencing mit den häufigsten Mutationen (mindestens 2 Mutationen in der WGS Kohorte)	34
Abbildung 6 Signifikant mutierte Gene in der WGS EBV+ DLBCL NOS Kohorte	35
Abbildung 7 Mutationen im targeted next generation tequencing (NGS Panel).....	36
Abbildung 8 Mutationstypen und Mutationshäufigkeit im NGS Panel.....	37
Abbildung 9 Übereinstimmungen von Mutationen bei verschiedenen DLBCL und unserer EBV+ DLBCL NOS Kohorte.....	39
Abbildung 10 Anreicherung bzw. Verminderung von Mutationen in bestimmten Stoffwechsel bzw. Signalwegen	40
Abbildung 11 Ausgewählte veränderte Signalwege im WGS	41
Abbildung 12 Lollipop Plot ausgewählter Gene	42
Abbildung 13 Mutationsfrequenz KMT2D und NOTCH2 bei 6q Deletion; Detail CNV Chr. 6 im WGS	43
Abbildung 14 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung mit 6q Sonde, links Deletion, rechts Wildtyp ohne Deletion, Vergrößerung 1000fach	44
Abbildung 15 ANKRD11, Mutation vs. Wildtyp.....	45
Abbildung 16 Überleben bei kombinierter Mutation von ARID1A und DAPK1, vs. Wildtyp.....	45
Abbildung 17 Kaplan Meier Kurve, Gesamtüberleben in Monaten GCB vs. Non GCB	69

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 EBV-Latenztypen und zugeordnete Malignome.....	8
Tabelle 2 EBV Antigene und ihre molekularen Zielstrukturen.....	9
Tabelle 3 Untersuchte Gene im NGS Panel und orientierende Schilderung des kodierten Proteins neben Funktion und Rolle in der Signaltransduktion.....	23
Tabelle 4 Klinikopathologische Merkmale der EBV+ DLBCL NOS Kohorte.....	30

8. Literaturverzeichnis

1. 64. WMA-Generalversammlung im Oktober 2013, Fortaleza (Brasilien) WMA DoH Übersetzung DE_Rev 190905
2. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. (2000) Distinct types of diffuse large B-Cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*(403):503–511
3. Ana Rath (2020) CHARGE Syndrom. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=de&Expert=138. Zugegriffen 02.Dezember.2020
4. Ana Rath (2020) KBG Syndrom. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_Simple.php?lng=DE. Zugegriffen 02.12.2020
5. Ansell SM (2016) Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 91(4):434–442
6. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2020) 1p34. <http://atlasgeneticsoncology.org/Bands/1p34.html#ABNORM>. Zugegriffen 02.Dezember 2020
7. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (2020) del17pNHL. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/del17pNHLID2083.html>. 02.12.2020
8. Bauer P (2014) Analyse von Genen. In: Moog U, Rieß O (Hrsg) *Medizinische Genetik für die Praxis*, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag. Thieme eRef. https://eref.thieme.de/ebooks/1067745?fromSearch=true&context=search#/ebook_1067745_SL43260954. Zugegriffen 04. Dezember 2020
9. Bavi P, Uddin S, Bu R, Ahmed M, Abubaker J, Balde V, Qadri Z, Ajarim D, Al-Dayel F, Hussain AR, Al-Kuraya KS. (2011) The biological and clinical impact of inhibition of NF- κ B-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *The Journal of pathology* 224(3):355–366
10. Beltran BE, Morales D, Quiñones P, Medeiros LJ, Miranda RN, Castillo JJ. (2011) EBV-positive diffuse large b-cell lymphoma in young immunocompetent individuals. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* 11(6):512–516
11. Benjamini Y, Speed TP (2012) Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic acids research* 40(10):e72
12. Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui WO, Backlin C, Thunberg U, Sundström C, Roos G, Allander SV, Erlanson M, Rosenquist R, Larsson C, Lagercrantz S. (2002) Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15(8):807–816
13. Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Nicoletti F, Malaponte G, Traval S, McCubrey JA, Canevari S, Libra M. (2010) Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9(3):557–563
14. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. (2018) EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American journal of hematology* 93(7):953–962

15. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics (Oxford, England)* 34(17):i884-i890
16. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G. (2013) Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nature biotechnology* 31(3):213–219
17. Sarkozy C, Hung SS, Chavez EA, Duns G, Takata K, Chong LC, Aoki T, Jiang A, Miyata-Takata T, Telenius A, Slack GW, Molina TJ, Ben-Neriah S, Farinha P, Dartigues P, Damotte D, Mottok A, Salles GA, Casasnovas RO, Savage KJ, Laurent C, Scott DW, Traverse-Glehen A, Steidl C. (2020) Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* <https://doi.org/10.1182/blood.2020007507> Zugegriffen 30. Dezember 2020
18. Sarkozy C, Hung SS, Chavez EA, Duns G, Takata K, Chong LC, Aoki T, Jiang A, Miyata-Takata T, Telenius A, Slack GW, Molina TJ, Ben-Neriah S, Farinha P, Dartigues P, Damotte D, Mottok A, Salles GA, Casasnovas RO, Savage KJ, Laurent C, Scott DW, Traverse-Glehen A, Steidl C. (2020) Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* <https://doi.org/10.1182/blood.2020007507> Zugegriffen 30. Dezember 2020
19. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma
20. Cox J, Mann M (2012) 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics* 13(16):S12
21. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, Pocock C, Ardeshna KM, Radford JA, McMillan A, Davies J, Turner D, Kruger A, Johnson P, Gambell J, Linch D. (2013) Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet* 381(9880):1817–1826
22. Dejardin E (2006) The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical pharmacology* 72(9):1161–1179
23. Diossy M, Sztupinszki Z, Krzystanek M, Borcsok J, Eklund AC, Csabai I, Pedersen AG, Szallasi Z. (2018) Strand Orientation Bias Detector (SOBDetector) to remove FFPE sequencing artifacts. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/386417v2>. Zugegriffen 05. Dezember 2020
24. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, Wlodarska I, Schragger JA, Raffeld M, Hills RK, Jaffe ES. (2011) Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood* 117(18):4726–4735
25. Epstein MA (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1:702–703
26. Fitzsimmons L, Kelly GL (2017) EBV and Apoptosis: The Viral Master Regulator of Cell Fate? *Viruses* 9(11)

27. Freeman CL, Savage KJ, Villa DR, Scott DW, Srouf L, Gerrie AS, Brown MJ, Slack GW, Farinha P, Skinnider B, Morris J, Bénard F, Aquino-Parsons C, Lo A, Pickles T, Wilson DC, Tonseth P, Connors JM, Sehn LH. (2017) Long-term results of PET-guided radiation therapy in patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in British Columbia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 130(Supplement 1):823
28. Gallagher D, Voronova A, Zander MA, Cancino GI, Bramall A, Krause MP, Abad C, Tekin M, Neilsen PM, Callen DF, Scherer SW, Keller GM, Kaplan DR, Walz K, Miller FD. (2015) Ankrd11 is a chromatin regulator involved in autism that is essential for neural development. *Developmental cell* 32(1):31–42
29. Gebauer J (2015) Molekulare Charakterisierung des Epstein-Barr Virus assoziierten diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms des älteren Menschen, Med. Diss. Universität zu Lübeck
30. Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, Thorns C, Feller AC, Merz H. (2015) TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations. *Leukemia & lymphoma* 56(1):179–185
31. Gene Cards® The human gene database ARID1A. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARID1A>. Zugegriffen 19. Dezember 2020
32. Gene Cards® The human gene database B2M Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=B2M>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
33. Gene Cards® The human gene database BCL2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2&keywords=BCL2#sources>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
34. Gene Cards® The human gene database BCL6 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL6&keywords=BCL6#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
35. Gene Cards® The human gene database BTG2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BTG2&keywords=BTG2#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
36. Gene Cards® The human gene database CARD11 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CARD11&keywords=CARD11#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
37. Gene Cards® The human gene database CCR6 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCR6&keywords=CCR6#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
38. Gene Cards® The human gene database CCR7 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCR7&keywords=CCR7#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
39. Gene Cards® The human gene database CD 70 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD70&keywords=CD70#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
40. Gene Cards® The human gene database CD274 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD274&keywords=CD274#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020

41. Gene Cards® The human gene database CD58 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD58&keywords=CD58#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
42. Gene Cards® The human gene database CREBBP-Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CREBBP&keywords=CREBBP#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
43. Gene Cards® The human gene database CSNK2B Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CSNK2B&keywords=CSNK2B#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
44. Gene Cards® The human gene database CXCL10 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL10&keywords=CXCL10#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
45. Gene Cards® The human gene database EZH2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EZH2&keywords=EZH2#function>
46. Gene Cards® The human gene database FAS Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAS&keywords=FAS#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
47. Gene Cards® The human gene database FOXO1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXO1&keywords=FOXO1#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
48. Gene Cards® The human gene database HIST1H1E Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H1-4&keywords=HIST1H1E#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
49. Gene Cards® The human gene database ID3 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ID3&keywords=ID3#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
50. Gene Cards® The human gene database IRF4 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF4&keywords=IRF4#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
51. Gene Cards® The human gene database KMT2A. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KMT2A&keywords=KMT2A#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
52. Gene Cards® The human gene database KMT2D. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KMT2D&keywords=KMT2D#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
53. Gene Cards® The human gene database MEF2B Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEF2B&keywords=MEF2B>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
54. Gene Cards® The human gene database MYC Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC&keywords=MYC#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
55. Gene Cards® The human gene database MYD 88 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYD88&keywords=MYD88>. Zugegriffen 23. Oktober 2020

56. Gene Cards® The human gene database NELL2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NELL2&keywords=NELL2#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
57. Gene Cards® The human gene database NOTCH2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOTCH2&keywords=NOTCH2#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
58. Gene Cards® The human gene database PIM1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIM1&keywords=PIM1#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
59. Gene Cards® The human gene database PRDM1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRDM1&keywords=PRDM1#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
60. Gene Cards® The human gene database Regulation of TP53 activity. https://pathcards.genecards.org/card/regulation_of_tp53_activity
61. Gene Cards® The human gene database SOCS1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOCS1&keywords=SOCS1>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
62. Gene Cards® The human gene database SOCS2 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOCS2&keywords=SOCS2#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
63. Gene Cards® The human gene database TCF 3 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TCF3&keywords=TCF3#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
64. Gene Cards® The human gene database TLR9 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR9&keywords=TLR9>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
65. Gene Cards® The human gene database TMEM 30A. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMEM30A&keywords=TMEM30A>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
66. Gene Cards® The human gene database TNFRSF21 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF21&keywords=TNFRSF21>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
67. Gene Cards® The human gene database TP53 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&keywords=TP53#function>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
68. Gene Cards® The human gene database YY1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YY1&keywords=YY1>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
69. Gene Cards® The human gene database (2020) CD79A Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD79A&keywords=CD79a#function>
70. Gene Cards® The human gene database (2020) DAPK1 Gene. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DAPK1&keywords=DAPK1>
71. Grande BM, Gerhard DS, Jiang A, Griner NB, Abramson JS, Alexander TB, Allen H, Ayers LW, Bethony JM, Bhatia K, Bowen J, Casper C, Choi JK, Culibrk L, Davidsen TM, Dyer MA, Gastier-Foster JM, Gesuwan P, Greiner TC, Gross TG, Hanf B, Harris NL, He Y, Irvin JD, Jaffe ES, Jones SJM, Kerchan P, Knoetze N, Leal FE, Lichtenberg TM, Ma Y, Martin JP, Martin MR, Mbulaiteye SM, Mullighan CG,

- Mungall AJ, Namirembe C, Novik K, Noy A, Ogwang MD, Omoding A, Orem J, Reynolds SJ, Rushton CK, Sandlund JT, Schmitz R, Taylor C, Wilson WH, Wright GW, Zhao EY, Marra MA, Morin RD, Staudt LM. (2019) Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood* 133(12):1313–1324
72. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, Chapuy B, Takeyama K, Neuberg D, Golub TR, Kutok JL, Shipp MA. (2010) Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 116(17):3268–3277
73. Grupe G, Suttorp N (2020) 189 Epstein-Barr-Virusinfektion; infektiöse Mononukleose. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B et al (Hrsg) *Harrisons Innere Medizin*, 20. Auflage. ABW Verlag. eRef Thieme Verlag: https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11262871#/ebook_cs_11262871_H20_K_189. Zugegriffen 20. Oktober 2020
74. Hammerschmidt W, Sugden B (2013) Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(1): a013029
75. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103(1):275–282
76. Hanzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2013 Jan 16
77. Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26(3):203–234
78. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. (2002) The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science (New York, N.Y.)* 298(5596):1241–1245
79. Hofscheier A, Ponciano A, Bonzheim I, Adam P, Lome-Maldonado C, Vela T, Cortes E, Ortiz-Hidalgo C, Fend F, Quintanilla-Martinez L. (2011) Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(8):1046–1054
80. Institute B. Picard Toolkit Picard Tools. <https://broadinstitute.github.io/picard/>. Zugegriffen 08. Dezember 2020
81. Janz M, Keller U (2020) 104 Non-Hodgkin-Lymphome. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B et al (Hrsg) *Harrisons Innere Medizin*, 20. Auflage. ABW Verlag. eRef Thieme Verlag https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11262871#/ebook_cs_11262871_H20_K_104. Zugegriffen 20. Oktober 2020
82. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR. (2013) Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nature genetics* 45(6):592–601
83. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A (2020) The CCL20-CCR6 Axis in Cancer Progression. *International journal of molecular sciences* 21(15)

84. Kaspi A. ZM (2020) mitch: multi-contrast pathway enrichment for multi-omics and single-cell profiling data. <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-06856-9>. Zugegriffen 10. November 2020
85. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. (2015) Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nature genetics* 47(11):1304–1315
86. Katzenstein A-LA, Doxtader E, Narendra S (2010) Lymphomatoid granulomatosis: insights gained over 4 decades. *The American journal of surgical pathology* 34(12):e35-48
87. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, Burkhardt B, Szczepanowski M, Salaverria I, Hummel M, Loeffler M, Pellissery S, Woessmann W, Schwänen C, Trümper L, Wessendorf S, Spang R, Hasenclever D, Siebert R. (2012) Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 119(8):1882–1887
88. Kocks JR, Adler H, Danzer H, Hoffmann K, Jonigk D, Lehmann U, Förster R. (2009) Chemokine receptor CCR7 contributes to a rapid and efficient clearance of lytic murine gamma-herpes virus 68 from the lung, whereas bronchus-associated lymphoid tissue harbors virus during latency. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(11):6861–6869
89. Kristensen LS, Asmar F, Dimopoulos K, Nygaard MK, Aslan D, Hansen JW, Ralfkiaer E, Grønbaek K. (2014) Hypermethylation of DAPK1 is an independent prognostic factor predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 5(20):9798–9810
90. Kwiecinska A, Tsesmetzis N, Ghaderi M, Kis L, Saft L, Rassidakis GZ. (2018) CD274 (PD-L1)/PDCD1 (PD-1) expression in de novo and transformed diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 180(5):744–748
91. Lane DP (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381):15–16
92. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, Morgan MT, Carey VJ. (2013) Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS computational biology* 9(8):e1003118
93. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortés ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander

- ES, Getz G. (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499(7457):214–218
94. Lee YT, Tan YJ, Oon CE (2018) Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European journal of pharmacology* 834:188–196
 95. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010 Apr 15;362(15):1417-29.
 96. Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. <https://arxiv.org/abs/1303.3997> Zugegriffen 20. November 2020
 97. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell systems* 1(6):417–425
 98. Liu F, Wang Z, Zhou X, Liu Q, Chen G, Xiao H, Yin W, Nakamura S, Rao H. (2018) Genetic heterogeneity and mutational signature in Chinese Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS ONE* 13(8):e0201546
 99. Lu TX, Liang JH, Miao Y, Fan L, Wang L, Qu XY, Cao L, Gong QX, Wang Z, Zhang ZH, Xu W, Li JY. (2015) Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma predict poor outcome, regardless of the age. *Scientific reports* 5:12168
 100. Mathur R (2018) ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacology & therapeutics* 190:15–23
 101. Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP. (2018) Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome research* 28(11):1747–1756
 102. Medline Plus ANKRD 11 Gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/ankrd11/#references>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
 103. Medline Plus ARID1A Gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/arid1a/#conditions>. Zugegriffen 23. Oktober 2020
 104. Miranda-Filho A, Piñeros M, Znaor A, Marcos-Gragera R, Steliarova-Foucher E, Bray F. (2019) Global patterns and trends in the incidence of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes & Control* 30(5):489–499
 105. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A (2016) Signaling via the NFκB system. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 8(3):227–241
 106. Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA, Lopez AB, de Villambrosía SG, Mazonra F, Castillo ME, Lopez M, Pajares R, García JF, Mollejo M, Camacho FI, Ruiz-Marcellán C, Adrados M, Ortiz N, Franco R, Ortiz-Hidalgo C, Suarez-Gauthier A, Young KH, Piris MA. (2012) EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-κB activation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25(7):968–982
 107. Moody S, Thompson JS, Chuang SS, Liu H, Raderer M, Vassiliou G, Wlodarska I, Wu F, Cogliatti S, Robson A, Ashton-Key M, Bi Y, Goodlad J, Du MQ. (2018) Novel GPR34 and CCR6 mutation and distinct genetic profiles in MALT lymphomas of different sites. *Haematologica* 103(8):1329–1336
 108. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107(1):265–276

109. Müller D (2019) Kabuki-Syndrom. In: Hübler A, Jorch G (Hrsg) Neonatologie, 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag eRef https://eref.thieme.de/ebooks/976850?fromSearch=true&context=search#/ebook_976850_SL38905728. Zugegriffen 21. Oktober 2020
110. National Center for Biothechnology Information KMT2A lysine methyltransferase 2A Homo sapiens (human). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4297> Zugegriffen 15. November 2020
111. National institute of Health The Cancer Genome Atlas. <https://www.cancer.gov/tcga>. Zugegriffen 28. Oktober 2020.
112. Neilsen PM, Cheney KM, Li CW, Chen JD, Cawrse JE, Schulz RB, Powell JA, Kumar R, Callen DF. (2008) Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator. *Journal of cell science* 121(Pt 21):3541–3552
113. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, Steinberg SM, Pham TA, Davies-Hill T, Xi L, Raffeld M, Jaffe ES. (2015) EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: a nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 126(7):863–872
114. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Manyam GC, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Chen J, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJ, Farnen JP, Møller MB, Bueso-Ramos CE, Miranda RN, Winter JN, Piris MA, Medeiros LJ, Young KH. (2014) Prevalence and clinical implications of epstein-barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(9):2338–2349
115. Ok CY, Pappathomas TG, Medeiros LJ, Young KH. (2013) EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood* 122(3):328–340
116. Orphanet (2020) Wiedemann Steiner Syndrom. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=319182. Zugegriffen 15. Dezember 2020
117. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, Suzumiya J, Ohshima K, Yatabe Y, Yokoi T, Kojima M, Kamiya Y, Tajiri H, Kagami Y, Ogura M, Saito H, Morishima Y, Nakamura S. (2003) Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *The American journal of surgical pathology* 27(1):16–26
118. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. (2007) Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(17):5124–5132
119. Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, Hwang IG, Park YH, Ahn JS, Jung CW, Kim K, Ahn YC, Kang WK, Park K, Kim WS. (2007) The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 110(3):972–978
120. Pasqualucci L, Zhang B (2016) Genetic drivers of NF-κB deregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in cancer biology* 39:26–31
121. Picart-Armada S, Thompson WK, Buil A, Perera-Lluna A. (2018) diffuStats: an R package to compute diffusion-based scores on biological networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* 34(3):533–534

122. Rizeq B, Malki MI (2020) The Role of CCL21/CCR7 Chemokine Axis in Breast Cancer Progression. *Cancers* 12(4)
123. Roberts CWM, Orkin SH (2004) The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nature reviews. Cancer* 4(2):133–142
124. Sarkozy C, Hung SS, Chavez EA, Duns G, Takata K, Chong LC, Aoki T, Jiang A, Miyata-Takata T, Telenius A, Slack GW, Molina TJ, Ben-Neriah S, Farinha P, Dartigues P, Damotte D, Mottok A, Salles GA, Casasnovas RO, Savage KJ, Laurent C, Scott DW, Traverse-Glehen A, Steidl C. (2020) Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* <https://doi.org/10.1182/blood.2020007507> Zugegriffen 30. Dezember 2020 Sarkozy C, Hung SS, Chavez EA et al. (2020) Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*
125. Schmidt CS, Liu J, Zhang T, Song HY, Sandusky G, Mintze K, Benschop RJ, Glasebrook A, Yang DD, Na S. (2003) Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6. *The Journal of experimental medicine* 197(1):51–62
126. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, Roulland S, Kasbekar M, Young RM, Shaffer AL, Hodson DJ, Xiao W, Yu X, Yang Y, Zhao H, Xu W, Liu X, Zhou B, Du W, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Lopez-Guillermo A, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Tay Kuang Wei K, Zelenetz AD, Leonard JP, Bartlett NL, Tran B, Shetty J, Zhao Y, Soppet DR, Pittaluga S, Wilson WH, Staudt LM. (2018) Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine* 378(15):1396–1407
127. Schuster F, Behrends U, Korn K, Nadal D, Wagner HJ. (2018) Epstein-Barr-Infektionen. In: Berner R, Bialek R, Forster J et al (Hrsg) *DGPI Handbuch*, 7., vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag eRef https://eref.thieme.de/ebooks/2352140#/ebook_2352140_SL88324356. Zugegriffen 28. Oktober 2020
128. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM. (2007) The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109(5):1857–1861
129. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM. (2007) The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109(5):1857–1861
130. Shain AH, Pollack JR (2013) The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS ONE* 8(1):e55119–e55119
131. Shimoyama Y, Yamamoto K, Asano N, Oyama T, Kinoshita T, Nakamura S. (2008) Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. *Cancer science* 99(6):1085–1091
132. Shyr C, Tarailo-Graovac M, Gottlieb M, Lee JJ, van Karnebeek C, Wasserman WW (2014) FLAGS, frequently mutated genes in public exomes. *BMC medical genomics* 7:64

133. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127(20):2375–2390
134. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research* 47(D1):D607–D613
135. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology* 7(11):1630–1636
136. Thermo Fisher Scientific (2010) Technologies, NanoDrop nd-1000-v3.8-users-manual-8 5x11(1)
137. Turner S. (2020) Molecular Signatures Database (MSigDB) in a data frame. <https://github.com/ToledoEM/msigdf>. Zugegriffen 02. Dezember 2020
138. Turnpenny PD, Ellard S (2012) Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European journal of human genetics : EJHG* 20(3):251–257
139. Wang K, Li M, Hakonarson H (2010) ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research* 38(16):e164
140. Wang M, Zhang S, Chuang SS, Ashton-Key M, Ochoa E, Bolli N, Vassiliou G, Gao Z, Du MQ. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: novel molecular insights by mutation profiling. *Oncotarget* 8(11):17763–17770
141. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, D'Agostino L, McGowans RF, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, LinPedersen T, Miller E, Milton Bache S, Müller K, Ooms J, Robinson D, Paige Seidel D; Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. (2019) Welcome to the Tidyverse. *JOSS* 4(43):1686
142. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Lih CJ, Williams PM, Shaffer AL, Gerecitano J, de Vos S, Goy A, Kenkre VP, Barr PM, Blum KA, Shustov A, Advani R, Fowler NH, Vose JM, Elstrom RL, Habermann TM, Barrientos JC, McGreivy J, Fardis M, Chang BY, Clow F, Munneke B, Moussa D, Beaupre DM, Staudt LM. (2015) Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature medicine* 21(8):922–926
143. Witte HM, Merz H, Biersack H, Bernard V, Riecke A, Gebauer J, Lehnert H, von Bubnoff N, Feller AC, Gebauer N. (2020) Impact of treatment variability and clinicopathological characteristics on survival in patients with Epstein-Barr-Virus positive diffuse large B cell lymphoma. *British Journal of Haematology* 189(2):257–268
144. Xia Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Li X, Manyam GC, Murty V, Bhagat G, Zhang S, Pasqualucci L, Visco C, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Møller MB, Parsons BM, Winter JN, Piris MA, Westin J, Fowler N, Miranda RN, Ok CY, Li Y, Li J, Medeiros LJ, Young KH. (2017) Loss of PRDM1/BLIMP-1 function contributes to poor prognosis of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 31(3):625–636

145. Xiu M-X, Liu Y-M (2019) The role of oncogenic Notch2 signaling in cancer: a novel therapeutic target. *Am J Cancer Res* 9(5):837–854
146. Yin H, Qu J, Peng Q, Gan R. (2019) Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Medical microbiology and immunology* 208(5):573–583
147. Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S, Wu GS, Wu K. (2015) Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer letters* 369(1):20–27
148. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, Vlasevska S, Mo T, Tang H, Basso K, Ge K, Dalla-Favera R, Pasqualucci L. (2015) Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nature medicine* 21(10):1190–1198
149. Zhou Y, Xu Z, Lin W, Duan Y, Lu C, Liu W, Su W, Yan Y, Liu H, Liu L, Zhong M, Zhou J, Zhu H. (2019) Comprehensive Genomic Profiling of EBV-Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma and the Expression and Clinicopathological Correlations of Some Related Genes. *Frontiers in oncology* 9:683

9. Anhang

Tabelle: klinikopathologische Charakteristika der auf 6q Deletion untersuchten Subgruppe von EBV+ DLBCL NOS		
Merkmale	6q Deletion (n = 14)	6q Wildtype (n = 18)
Alter (Jahre; Median + Spanne)	76.5 (51 – 81)	68.5 (40 – 90)
Geschlecht		
Weiblich	5 (35.7%)	8 (44.4%)
Männlich	9 (64.3%)	10 (55.6%)
R-IPi		
0	1 (7.1%)	1 (5.6%)
1-2	7 (50.0%)	8 (44.4%)
>2	6 (42.9%)	9 (50.0%)
Stadium (Ann Arbor)		
I	2 (14.3%)	4 (22.2%)
II	6 (42.9%)	5 (27.8%)
III	5 (35.7%)	3 (16.7%)
IV	1 (7.1%)	6 (33.3%)
B-Symptome		
Yes	5 (35.7%)	11 (61.1%)
No	9 (64.3%)	7 (38.9%)
CD30 (immunohistochemisch)		
Positive	10 (71.4%)	13 (72.2%)
Negative	4 (28.6%)	5 (27.8%)
Extranodaler Befall		
0	8 (57.1%)	9 (50.0%)
1-2	6 (42.9%)	9 (50.0%)
ECOG PS		
0-1	5 (35.7%)	8 (44.4%)
≥2	9 (64.3%)	10 (55.6%)
LDH		
Normal	6 (42.9%)	8 (44.4%)
Erhöht	8 (57.1%)	10 (55.6%)
ZNS Beteiligung bei Diagnose		
Ja	1 (7.1%)	2 (11.1%)
Nein	13 (92.9%)	17 (94.4%)
Erstlinientherapie		
CHOP-like	9 (64.3%)	14 (77.8%)
R-basiert	12 (85.7%)	17 (94.4%)
Andere	1 (7.1%)	1 (5.6%)
Ablehnen der Therapie	-	-
Ansprechraten auf Erstlinientherapie		
CR	9 (64.3%)	13 (72.2%)
VGPR	-	1 (5.6%)
PR	4 (28.6%)	1 (5.6%)
SD	1 (7.1%)	2 (11.1%)
PD	-	1 (5.6%)
EBV, Epstein Barr Virus; ZNS, Zentrales Nervensystem; LDH, Lactat Dehydrogenase; ECOG; Eastern cooperative oncology group; PS, performance status; CHOP, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolone; R, Rituximab; Andere z.B. Bendamustin oder palliative zytoreduktive Behandlung		

9.1. Inferenz Statistik: SPSS Ausgaben;Kaplan Meier Kurven

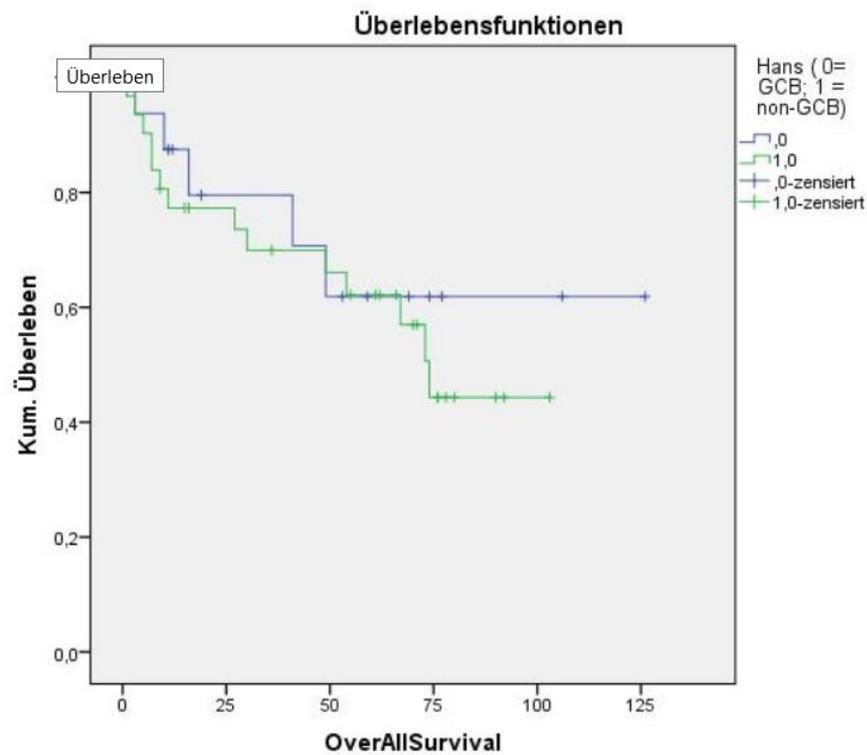


Abbildung 17 Kaplan Meier Kurve, Gesamtüberleben in Monaten GCB vs. Non GCB

Hans (0= GCB; 1 = non-GCB) * death event

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymp. Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	,848 ^a	1	,357	,532	,274
Kontinuitätskorrektur ^b	,369	1	,544		
Likelihood-Quotient	,863	1	,353	,532	,274
Exakter Test nach Fisher				,532	,274
Anzahl der gültigen Fälle	47				

Hans (0= GCB; 1 = non-GCB) * Rezidiv-Event

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymp. Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punktwahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	,086 ^a	1	,769	1,000	,511	
Kontinuitätskorrektur ^b	,000	1	1,000			
Likelihood-Quotient	,087	1	,769	1,000	,511	
Exakter Test nach Fisher				1,000	,511	
Zusammenhang linear-mit-linear	,084 ^c	1	,771	1,000	,511	
Anzahl der gültigen Fälle	47					

SexM0W1 * death event

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymp. Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)
Pearson-Chi-Quadrat	,196 ^a	1	,658	,763	,444
Kontinuitätskorrektur ^b	,019	1	,891		
Likelihood-Quotient	,195	1	,659	,763	,444
Exakter Test nach Fisher				,763	,444
Anzahl der gültigen Fälle	47				

SexM0W1 * Rezidiv-Event

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymp. Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punktwahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	,196 ^a	1	,658	,763	,444	
Kontinuitätskorrektur ^b	,019	1	,891			
Likelihood-Quotient	,195	1	,659	,763	,444	
Exakter Test nach Fisher				,763	,444	
Zusammenhang linear-mit-linear	,191 ^c	1	,662	,763	,444	
Anzahl der gültigen Fälle	47					

9.2. Danksagung

Für die vorliegende Arbeit waren die Beiträge, Hilfen, technische Unterstützung vieler Personen sehr hilfreich. Insbesondere möchte ich hier vor allen anderen meinem Doktorvater PD Dr. med. Niklas Gebauer aus der Klinik für Innere Medizin für den spannenden Themenvorschlag, seine Flexibilität bei Terminabsprachen, ordentlichen und außerordentlichen Arbeitsgruppentreffen den allzeit verfügbaren Rat, konstruktive Kritik, sein Netzwerknaturtalent und dabei immer große Freundlichkeit danken. Mein weiterer Dank geht an dieser Stelle an Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff für das Ermöglichen der Dissertation in der Klinik für Hämatologie und Onkologie.

Für den Weg durch den Irrgarten der Bioinformatik und die tolle Unterstützung bei der komplexen Auswertung der Rohdaten geht mein besonderer Dank an Dr. rer. nat. Axel Künstler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Hauke Busch aus der Systembiologie an der Universität zu Lübeck.

Für die gute Zusammenarbeit und den Zugriff auf die Tumorproben dieser sehr seltenen Entität geht mein Dank an die Hämatopathologie Lübeck unter Leitung von Prof. Dr. Alfred Feller und für die reibungslose, unkomplizierte Zusammenarbeit mit dem Labor der Hämatopathologie an Dr. rer. nat. Veronica Bernard.

Für die externen Laborpartner und die Laborassistenz geht mein Dank an das Labor der Stefan Morsch Stiftung; namentlich Dr. rer. nat. Wolfgang Peter, Peter Trojok und Yannik Busch, sowie an die Kollegen des EMBL in Heidelberg, namentlich Dr. rer. nat. Vladimir Benes, Dr. rer. nat. Tobias Rausch und Dr. rer. nat. Jürgen Zimmermann. Weiterhin möchte ich mich beim Institut für Tumorgenetik Nord namentlich bei Dr. med. Lana Harder, Katharina Ratjen und Dr. rer. nat. Stefan Gesk bedanken.

Für Ihre Geduld und die tolle Unterstützung, trotz privater Einschränkungen einer berufsbegleitenden Dissertation in einem schwierigen Jahr, möchte ich meiner Freundin Janna Ruck ganz besonders danken.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Julius Ketzer

Geburtstag: 03.01.1988

Geburtsort: Remscheid

Anschrift: Wakenitzufer 4, 23564 Lübeck



Hochschulausbildung:

- 2008 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
- 2010 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: gut (2,5)
- 2013-2014 Praktisches Jahr in den Kliniken für Innere Medizin, Chirurgie und Kinder- und Jugendmedizin des UKSH Campus Lübeck
- 2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: sehr gut (1,5)
- Seit 2015 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein,
- 2019-2020 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Klinik für Innere Medizin, UKSH Campus Lübeck
- 2020 Facharztprüfung für Kinder- und Jugendmedizin
- 2020 Beginn der Zusatzweiterbildung Pädiatrische Hämatologie- Onkologie

Publikation:

Ketzer J, Lauten M, Langer T, Demmert M, Ernst F, Stille C, Till AM. Therapieverlauf des Morbus Hodgkin bei einem Kind mit kongenitaler lamellärer Ichthyose [Treatment of Morbus Hodgkin in a Child with Congenital Lamellar Ichthyosis]. *Klin Padiatr.* 2017 Nov;229(6):350-351. German. doi: 10.1055/s-0043-116851. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28806844.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bei Leukemia unter dem Titel „**Genomic insights into the pathogenesis of Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma by whole-genome and targeted amplicon sequencing**“ zur Veröffentlichung eingereicht

9.4. Erklärung

Gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe in der Klinik für Innere Medizin des UKSH Lübeck unter Betreuung durch PD. Dr. med. Niklas Gebauer angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Julius Ketzer